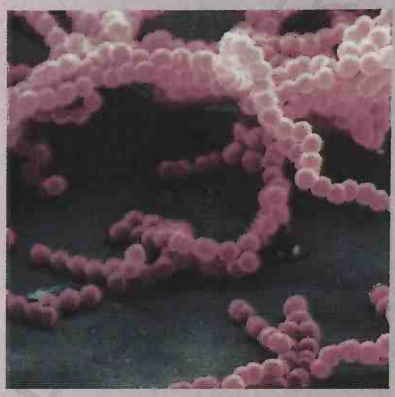
SIMONA DUNCA
ERICA NIMIȚAN

OCTĂVIȚA AILIESEI
MARIUS ȘTEFAN



MICROBIOLOGIE APLICATĂ

Th 288.615

Casa Editorială
DEMIURG

BCU CLUJ / CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAŞI
III 284. 615

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SIMONA DUNCA
ERICA NIMIȚAN

OCTĂVIȚA AILIESEI
MARIUS ȘTEFAN

MICROBIOLOGIE APLICATĂ

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

SIMONA DUNCA
ERICA NIMIȚAN
OCTĂVIȚA AILIESEI
MARIUS ȘTEFAN

410.901

MICROBIOLOGIE APLICATĂ

ALE
402389
B.C.U. IASI

Casa Editorială *Demiurg*
Iași * 2007

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Referenţi ştiinţifici:
Prof. dr. **Vlad Artenie**, Universitatea „Al. I. Cuza", Iaşi
Prof. dr. **Constantin Măzăreanu**, Universitatea Bacău

Casa Editorială *Demiurg*
✉ Şoseaua Păcurari nr. 68, bl. 550, sc. B, et. 4, ap. 16
700547 - Iaşi, România

☎ 0232/25.70.33; 0745/37.81.50; 0745/90.20.23
E-mail: iionita@mail.dntis.ro; ceddemiurg@yahoo.fr

Consilier editorial: dr. Alexandrina Ioniţă

Director Marketing:
Irina Ioniţă (☎ 0740/08.20.05).
Editura răspunde la comenzi în limita tirajului disponibil.

Editură acreditată de CNCSIS în 2003, reacreditată în 2006.

ISBN: 978-973-7603-79-1

© Toate drepturile asupra acestei lucrări aparţin autorilor.
Nici o parte din acest volum nu poate fi copiată sau transmisă prin nici un mijloc (electronic, fotocopiere etc.) fără permisiunea scrisă a autorilor.

Tehnoredactare computerizată: Marius Ştefan, Simona Dunca
Coperta: Eugen Ungureanu

16. FEB. 2007

PREFAȚĂ

Microbiologia – ca știință biologică fundamentală și în același timp aplicativă, deschide studenților orizonturi largi asupra unei lumi invizibile, atât de prezentă în viața și activitatea noastră de fiecare zi.

*Lucrarea intitulată „**MICROBIOLOGIE APLICATĂ**" este o încercare de a reuni într-un tot unitar, metode și tehnici microbiologice testate și verificate în laboratorul de microbiologie, reproductibile de orice persoană interesată.*

Datorită caracterului didactic al lucrării, pe baza experienței acumulate în predarea activității practice din domeniul microbiologiei și activității de cercetare științifice, autorii au avut permanent în vedere corelarea acestor metode și tehnici cu capitolele cursului de microbiologie.

Manualul se adresează studenților biologi care își întregesc astfel pregătirea lor ca viitori specialiști, fapt ce le va permite o mai rapidă integrare în laboratoarele de profil microbiologic în care unii dintre ei vor lucra.

Suntem îndatorați domnilor Prof. dr. VLAD ARTENIE – *Universitatea „Al. I. Cuza" Iași și* Prof. dr. CONSTANTIN MĂZĂREANU – *Universitatea Bacău pentru acceptarea de a fi referenți științifici, pentru timpul acordat analizei materialului prezentat și referatele pozitive întocmite.*

Autorii

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

1. ORGANIZAREA ŞI DOTAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE 11
1.1. AMENAJAREA LABORATORULUI 11
1.2. DOTAREA LABORATORULUI ŞI PREGĂTIREA MATERIALELOR 12
1.3. MĂSURI SPECIFICE DE PROTECŢIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE 18
2. STERILIZAREA 21
2.1. STERILIZAREA PRIN AGENŢI FIZICI 21
2.1.1. Metode de sterilizare prin căldură uscată 21
2.1.2. Metode de sterilizare prin căldură umedă 23
2.1.3. Filtrarea 28
2.1.4. Sterilizarea cu radiaţii ultraviolete 29
2.1.5. Sterilizarea cu ultrasunete 30
2.1.6. Sterilizarea cu etilen-oxid 30
2.2. STERILIZAREA PRIN AGENŢI CHIMICI 31
3. MEDII DE CULTURĂ 34
3.1. DEFINIŢIE, CONDIŢII, CLASIFICARE 34
3.2. CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ 34
3.3. PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ 36
3.3.1. Prepararea mediilor simple 36
3.3.2. Prepararea mediilor complexe 39
3.3.3. Prepararea mediilor speciale 40
3.3.3.1. Medii de îmbogăţire 40
3.3.3.2. Medii selective 41
3.3.3.3. Medii elective 43
3.3.3.4. Medii diferenţiale 44
3.3.3.5. Medii de conservare 45
3.3.4. Medii folosite pentru izolarea actinomicetelor 46
3.3.5. Medii folosite pentru dezvoltarea levurilor .. 46
3.3.6. Medii folosite pentru cultivarea micromicetelor 48
3.4. DETERMINAREA pH-ULUI MEDIILOR DE CULTURĂ 49
4. ÎNSĂMÂNŢAREA MEDIILOR DE CULTURĂ, OBŢINEREA CULTURILOR PURE, CULTURI ŞI COLONII MICROBIENE 56
4.1. TEHNICI DE ÎNSĂMÂNŢARE 56
4.2. OBŢINEREA CULTURILOR PURE 60
4.2.1. Izolarea pe medii solide 61
4.2.2. Izolarea pe medii speciale 64

BCU LIBRARY

4.2.3. Izolarea bazată pe particularitățile de comportare ale bacteriilor față de agenții fizici, chimici şi biologici 64
4.2.4. Izolarea prin metode biologice 64
4.3. CULTURI ŞI COLONII MICROBIENE 65
5. TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR MORFOLOGICE ŞI TINCTORIALE ALE BACTERIILOR 70
5.1. EXAMENUL MICROSCOPIC 70
5.1.1. Examenul bacteriilor în stare vie 70
5.1.2. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate 71
5.2. METODE DE COLORARE 73
5.2.1. Colorația simplă 73
5.2.2. Colorații compuse 74
5.2.3. Colorații speciale 77
6. METODE DE MICROSCOPIE UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE 95
6.1. MICROSCOPUL FOTONIC CU FOND CLAR 96
6.2. MICROSCOPUL CU FOND NEGRU (CU CÂMP ÎNTUNECAT) 103
6.3. MICROSCOPUL CU CONTRAST DE FAZĂ 105
6.4. MICROSCOPUL CU RAZE ULTRAVIOLETE 106
6.5. MICROSCOPUL ELECTRONIC CU TRANSMISIE .. 110
6.6. MICROSCOPUL ELECTRONIC CU BALEIAJ 115
7. MORFOLOGIA ŞI DIMENSIUNILE BACTERIILOR 119
7.1. MORFOLOGIA BACTERIILOR 119
7.2. DIMENSIUNILE BACTERIILOR 132
7.3. MOBILITATEA BACTERIILOR 134
8. IDENTIFICAREA UNEI BACTERII NECUNOSCUTE 137
8.1. OBȚINEREA ŞI PĂSTRAREA CULTURILOR STOC 138
8.2. STUDIUL MORFOLOGIC AL UNEI BACTERII NECUNOSCUTE 140
8.2.1. Caractere de cultură 140
8.3. STUDIUL CARACTERELOR FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE 144
8.3.1. Biooxidări 144
8.3.2. Reacții de hidroliză 152
8.3.3. Teste diverse 156
9. ALTE GRUPE DE BACTERII 162
9.1. ACTINOMICETELE 162
10. DROJDIILE (LEVURILE) 166
10.1. METODE ŞI TEHNICI DE STUDIU A LEVURILOR 171

BCU "Ion Creangă" LIBRARY

10.2. TEHNICI DE APRECIERE A ACTIVITĂȚII METABOLICE A LEVURILOR 174
10.3. METODE DE DETERMINARE A PUTERII FERMENTATIVE A LEVURILOR 175
11. FUNGII FILAMENTOȘI (MICROMICETELE) 178
12. METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE 182
12.1. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII LA BACTERIOFAGI A UNEI TULPINI BACTERIENE 183
12.2. IZOLAREA BACTERIOFAGILOR 184
12.2.1. Metoda directă de izolare 184
12.2.2. Metoda prin multiplicare 186
12.3. TITRAREA BACTERIOFAGILOR 186
12.4. APLICAȚIILE PRACTICE ALE FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE 187
13. STUDIUL PRINCIPALILOR FACTORI CARE CONDIȚIONEAZĂ STAREA DE IMUNITATE 190
13.1. FACTORII CELULARI AI IMUNITĂȚII (IMUNITATEA CELULARĂ) 190
13.1.1. Principalele tipuri de celule cu proprietăți fagocitare 191
13.1.2. Studiul fenomenului de fagocitoză 195
13.1.3. Determinarea indicelui opsono-citofagic, ca interrelație între procesele celulare și cele umorale de imunitate 196
13.2. REACȚIILE DINTRE ANTIGEN ȘI ANTICORP (REACȚII SEROLOGICE) 198
13.2.1. Reacția de aglutinare (seroaglutinarea) 199
13.2.2. Reacția de precipitare (seroprecipitarea) 202
13.2.3. Reacția de hemoliză 207
14. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE (ANTIBIOGRAMA) 210
14.1. METODA DIFUZIMETRICĂ KIRBY-BAUER 210
14.2. METODA DILUȚIILOR SERIATE (DETERMINAREA C.M.I.) 212
15. DETERMINAREA NUMĂRULUI DE MICROORGANISME DIN DIFERITE MEDII NATURALE 217
15.1. MICROBIOTA SOLULUI 220
15.1.1. Determinarea microbiotei din sol – metoda pe mediu solid 220
15.1.2. Determinarea microbiotei din sol – metoda în mediu lichid 220
15.2. MICROBIOTA APEI 223

B.C.U. „M. EMINESCU" IAȘI

15.2.1. Metode de analiză curentă 224
15.3. EXAMINAREA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI 239
15.3.1. Metoda de sedimentare Koch 239
15.3.2. Metode aspirative 241
15.4. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ŞI A PRODUSELOR LACTATE 246
15.4.1. Determinarea numărului total de germeni .. 247
15.4.2. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme 249
15.4.3. Determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri 251
15.4.4. Proba reductazei 253
16. STUDIUL PRINCIPALELOR GRUPE ECOFIZIOLOGICE DE MICROORGANISME CARE PARTICIPĂ LA CIRCUITUL ELEMENTELOR BIOGENE ÎN NATURĂ 255
16.1. CIRCUITUL AZOTULUI 255
16.1.1. Fixarea azotului atmosferic 256
16.1.1.1. Microorganisme libere fixatoare de azot 256
16.1.1.2. Bacteriile simbiotice fixatoare de azot atmosferic 261
16.1.2. Proteoliza 266
16.1.3. Amonificarea 267
16.1.4. Nitrificarea 270
16.1.5. Denitrificarea 271
16.2. CIRCUITUL CARBONULUI 272
16.2.1. Celulozoliza 273
16.2.2. Amiloliza 275
16.2.3. Pectinoliza 276
16.3. CIRCUITUL SULFULUI 278
16.3.1. Mineralizarea sulfului organic 278
16.3.2. Oxidarea compuşilor minerali ai sulfului (sulfoxidarea) 279
16.3.3. Reducerea compuşilor minerali oxidaţi ai sulfului (sulfatoreducerea) 283
ANEXĂ-PREPARAREA COLORANŢILOR ŞI REACTIVILOR 285
BIBLIOGRAFIE 290

1. ORGANIZAREA ŞI DOTAREA LABORATORULUI DE MICROBIOLOGIE

1.1. AMENAJAREA LABORATORULUI

Organizarea şi dotarea unui laborator de microbiologie trebuie să satisfacă cerinţele esenţiale care să asigure posibilităţi de lucru pentru efectuarea în bune condiţii a experienţelor şi să evite infectarea personalului. Astfel, încăperile laboratorului trebuie să aibă lumină naturală sau artificială corespunzătoare, să fie ferite de curenţi de aer care ar putea să vehiculeze microorganismele, să fie situate în locuri lipsite de praf. Trebuie să aibă pardoselele netede (din mozaic sau parchet acoperit cu linoleum) pentru a putea fi uşor spălate şi dezinfectate. Pereţii trebuie să fie îmbrăcaţi cu faianţă. De asemenea, camerele trebuie să fie prevăzute cu reţele de gaz, apă şi canal, precum şi cu prize electrice.

Pentru a asigura o bună funcţionalitate, laboratorul va cuprinde:

- *un spaţiu pentru pregătirea materialelor* (medii, tuburi, plăci, instrumentar, diverse recipiente de sticlă etc.);
- *un spaţiu pentru sterilizarea* mediilor de cultură, a tuburilor şi plăcilor Petri, a sticlăriei şi instrumentarului;
- *o boxă cu lămpi de sterilizare*, lipsită complet de posibilităţi de contaminare; în boxă se vor repartiza steril mediile de cultură, se vor efectua repicări pentru culturi pure sau pentru întreţinerea tulpinilor izolate sau orice alte lucrări care impun o deosebită atenţie pentru evitarea infectării sau contaminării.

Se va evita contactul materialelor sterile cu produsele sau materialele infectate.

Recipientele cu produse microbiologice se vor depune într-un spaţiu al laboratorului care să le protejeze de o suprainfectare externă.

În raport cu spaţiul şi funcţionalitatea sa, laboratorul va fi înzestrat cu următorul mobilier şi echipamente (Fig. 1):

- mese de lucru din metal, acoperite cu plăci de faianţă sau plăci de sticlă;
- taburete metalice rotative;
- dulapuri de metal pentru reactivi şi sticlărie;
- frigidere pentru conservarea mediilor de cultură, a suspensiilor bacteriene, a serurilor şi a diferitelor tulpini microbiene izolate;
- găleţi de metal pentru colectarea materialului infectant (de preferat găleţi cu pedală);

- becuri Bunsen;
- stelaje pentru uscat sticlărie;
- stative din lemn pentru eprubete;
- stative pentru colorare.

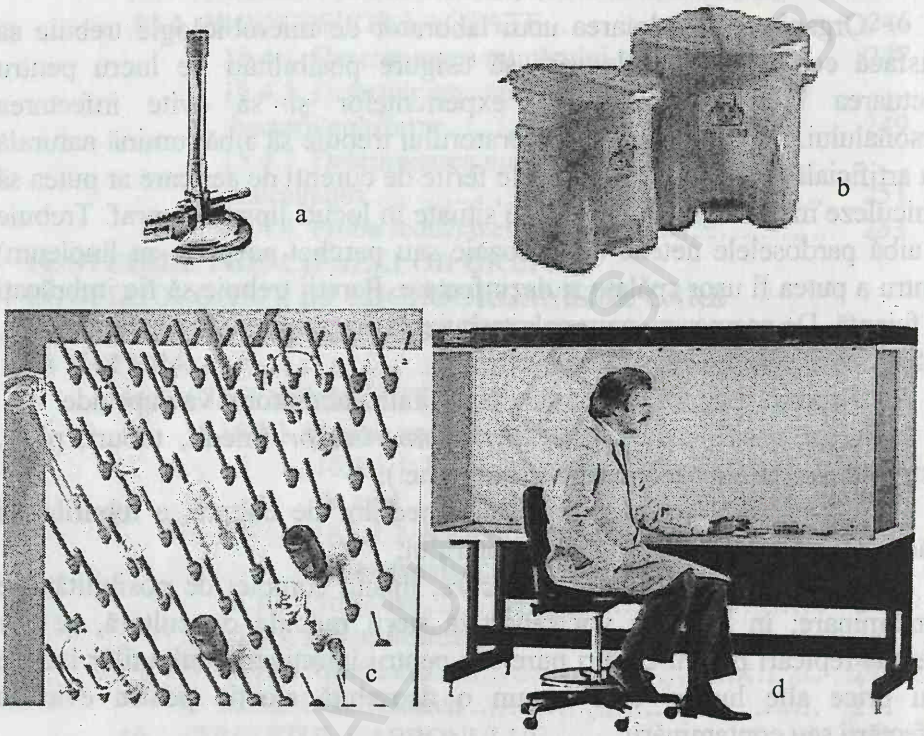


Fig. 1 – Echipamente de laborator: a - bec Bunsen; b - găleţi pentru colectarea materialelor infectante; c - stelaje pentru uscat sticlăria; d - boxă sterilă.

1.2. DOTAREA LABORATORULUI ŞI PREGĂTIREA MATERIALELOR

Laboratorul de microbiologie trebuie utilat cu aparate, instrumente şi sticlărie corespunzătoare, unele fiind specifice iar altele comune şi altor laboratoare.

Aparatura de laborator:

- microscoape de diferite tipuri;
- sterilizatoare electrice;
- termostate, ultratermostate şi aparate de anaerobioză pentru cultivarea microorganismelor;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- autoclav;
- boxă pentru lucru în condiţii aseptice;
- frigidere pentru păstrarea şi conservarea culturilor şi mediilor;
- diferite aparate pentru lucrări curente, balanţe farmaceutice şi analitice, centrifuge şi ultracentrifuge, agitatoare, băi de apă, pompă de vid, filtre, pH-metre, lămpi cu UV, coagulator etc.

Sticlăria de laborator (Fig. 2):

- lame şi lamele pentru microscopie;
- baghete pentru etalare;
- pipete gradate cu bulă şi pipete Pasteur;
- eprubete de diferite mărimi: eprubete (tuburi) Wassermann, eprubete Roux (gâtuite în partea inferioară), eprubete Weinberg (pentru culturi anerobe);
- baloane cu fund plat, baloane Erlenmeyer, baloane cotate, baloane Kitasato pentru filtrare şi baloane Fernbach pentru cultivarea microorganismelor ce necesită cantităţi mari de oxigen;
- cutii (plăci) Petri şi cutii (plăci) Roux;
- sticle şi borcane cu dop şlefuit, incolore şi colorate;
- cilindri gradaţi, cristalizoare, baghete de sticlă, capsule de porţelan;
- pahare conice şi pahare Berzelius;
- exicatoare, pâlnii, tuburi de fermentaţie Durham.

Instrumente şi materiale (Fig. 3):

- ace şi anse de însămânţare;
- bisturie, foarfece, pensete, spatule şi linguriţe de cântărit;
- becuri de gaz şi lămpi cu spirt;
- trepiede pentru încălzit şi site de azbest;
- stative pentru eprubete şi pentru pipete;
- tăvi şi stative pentru colorare;
- cutii pentru preparate microscopice;
- coşuri de sârmă pentru eprubete;
- vată hidrofilă;
- hârtie de celuloză şi hârtie pergamentată pentru împachetat sticlăria în timpul sterilizării;

- termometre;
- agar-agar sub formă de fibre sau pulbere.

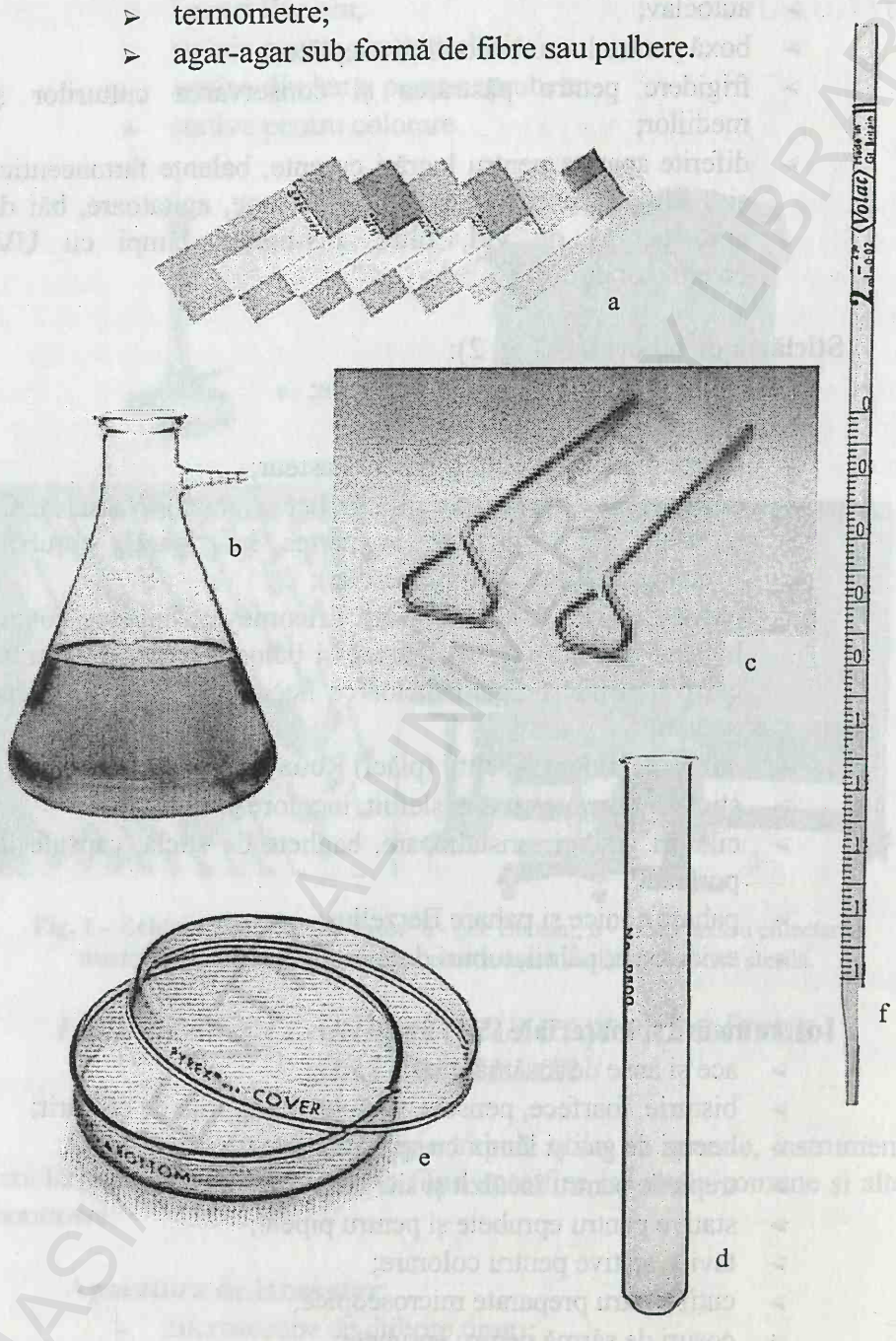


Fig. 2 – Sticlărie de laborator: a - lame de sticlă; b - balon Kitasato; c - baghete de etalare; d - eprubetă; e - cutie Petri; f - pipetă.

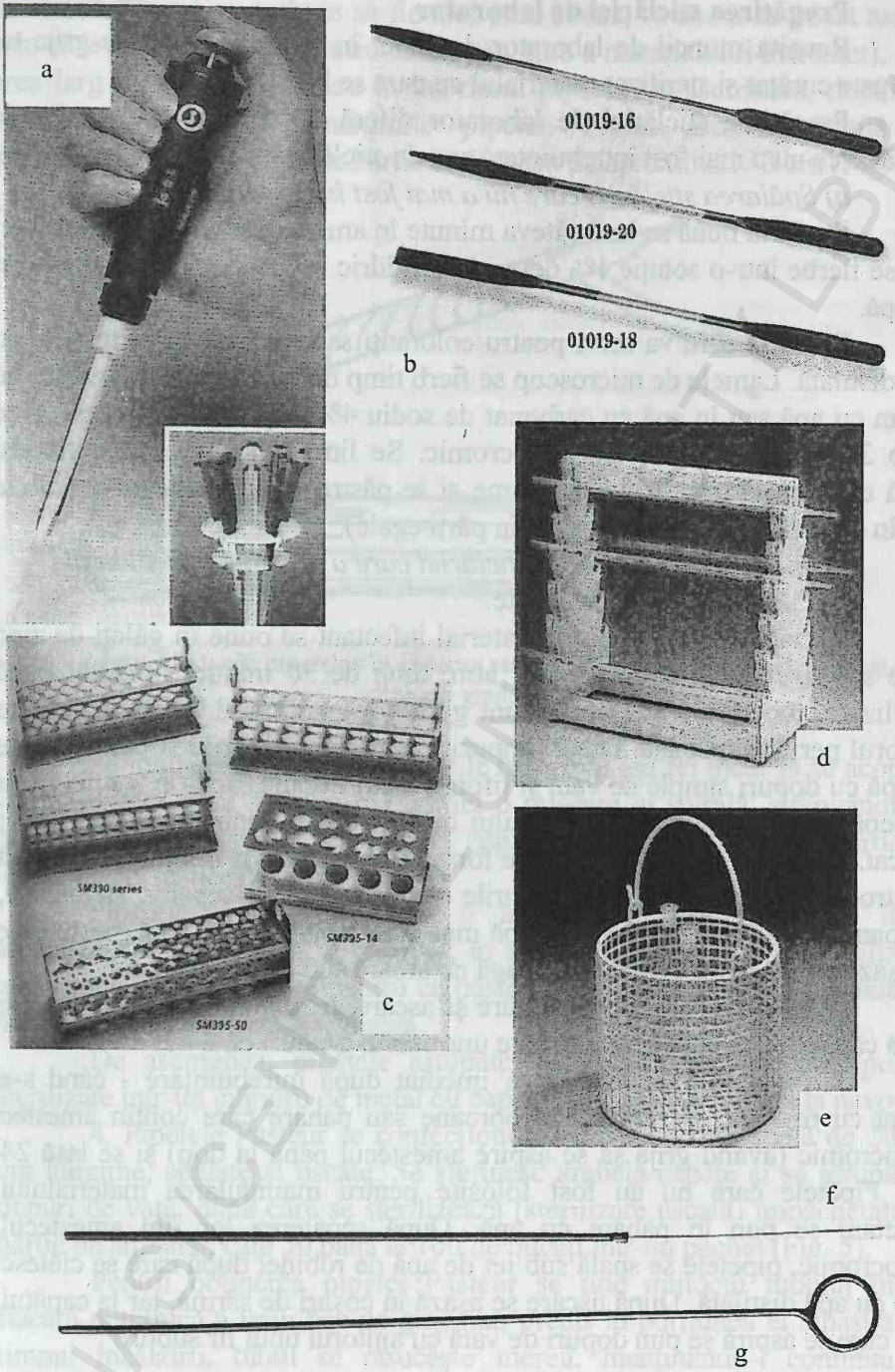


Fig. 3 – Instrumente de laborator: a-micropipetă; b-spatule; c-stative pentru eprubete; d-stativ pentru pipete; e-coş pentru eprubete; f-ac de însămânțare; g-ansă de însămânțare.

Pregătirea sticlăriei de laborator

Reuşita muncii de laborator depinde, în mare măsură, de grija cu care este curăţat şi sterilizat materialul cu care se lucrează.

Pregătirea sticlăriei de laborator diferă după cum este vorba de sticlărie ce nu a mai fost întrebuinţată sau de sticlărie cu care s-a mai lucrat.

a) Spălarea sticlăriei care nu a mai fost întrebuinţată

Sticlăria nouă se lasă câteva minute în amestec oxidant sulfocromic* sau se fierbe într-o soluţie 1% de acid clorhidric. Se spală apoi bine sub jet de apă.

Sticlăria care va servi pentru coloranţi sau reactivi se clăteşte şi cu apă distilată. Lamele de microscop se fierb timp de 30 minute în amestec de săpun cu apă sau în apă cu carbonat de sodiu 4%. Apoi se limpezesc şi se fierb 30 minute în amestec sulfocromic. Se limpezesc, se şterge fiecare lamă cu o cârpă uscată şi fără scame şi se păstrează împachetate în hârtie sau în cristalizoare cu alcool-eter (în părţi egale).

b) Spălarea şi pregătirea sticlăriei care a mai fost întrebuinţată

1. Tuburi, baloane, pâlnii etc.

Sticlăria care a conţinut material infectant se pune în găleţi de zinc şi se sterilizează la autoclav, la 2 atm, timp de 30 minute. Imediat după sterilizare, tuburile şi baloanele sunt golite de conţinutul lor şi spălate cu ajutorul periilor speciale. După limpezire şi uscare, tuburile şi baloanele se astupă cu dopuri simple de vată şi tifon. Dopul trebuie făcut în aşa fel încât să depăşească marginile recipientului cu o treime, pentru a putea fi uşor apucat. Dopul trebuie să-şi păstreze forma când este scos din tub şi să poată fi introdus cu uşurinţă la loc. Tuburile se împachetează separat. Baloanele, flacoanele Erlenmeyer ş.a. se astupă mai întâi cu dopuri de vată, peste care se aşază o bucată de hârtie ce se leagă cu sfoară sub buza balonului.

2. Plăcilor Petri, după spălare şi uscare, li se potrivesc cu grijă cele două capace şi se împachetează câte una sau în grupuri de 2 - 5.

3. Pipetele gradate se pun imediat după întrebuinţare - când s-a lucrat cu material infectant - în borcane sau pahare care conţin amestec sulfocromic (având grijă să se aspire amestecul până la dop) şi se lasă 24 ore. Pipetele care nu au fost folosite pentru manipularea materialului infectant se pun în pahare cu apă. După scoaterea lor din amestecul sulfocromic, pipetele se spală sub jet de apă de robinet după care se clătesc bine cu apă distilată. După uscare se aşază în coşuri de sârmă, iar la capătul prin care se aspiră se pun dopuri de vată cu ajutorul unui fir subţire

*Prepararea amestecului sulfocromic: se dizolvă prin încălzire 50 g bicromat de potasiu în 200 ml apă distilată. După răcire, se adaugă 800 ml apă şi 500 ml acid sulfuric tehnic.

de sârmă. Dopul nu trebuie să fie nici prea strâns, ca să nu se poată aspira prin el (evitându-se astfel introducerea în gură a materialului infectant), nici prea larg ca să se deplaseze în interiorul pipetei; de asemenea, dopul nu trebuie să depăşească marginile pipetei. Pipeta astfel pregătită se împachetează într-o fâşie de hârtie cu lăţimea de aproximativ 3 cm (Fig. 4).

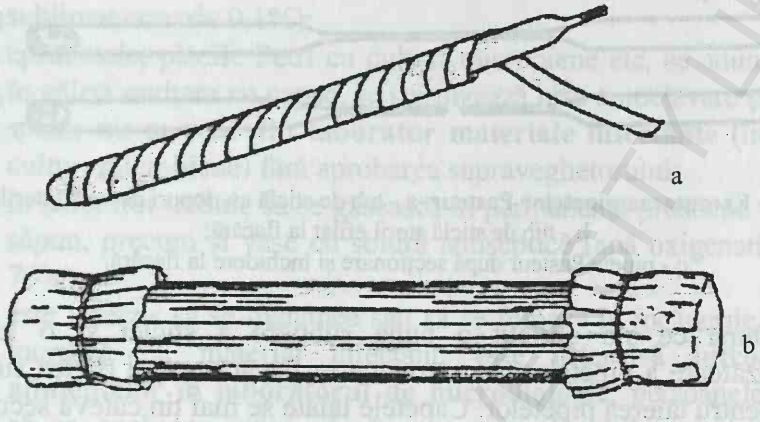


Fig. 4 – Împachetarea pipetelor în vederea sterilizării: a - pipeta gradată; b - grup de pipete gradate.

Se îndoaie una din extremităţile hârtiei în aşa fel încât să se acopere vârful pipetei, apoi se imprimă hârtiei o mişcare în spirală, strângându-se bine pe suprafaţa sticlei. La nivelul capătului cu care se aspiră, hârtia se îndoaie şi se răsuceşte strâns.

Pipetele gradate mai pot fi ambalate pentru sterilizare după aplicarea dopului, direct în pachete; în acest caz este bine să se utilizeze toate pipetele la o lucrare pentru că păstrarea lor, neînfăşurate în banda de hârtie, nu le garantează sterilitatea.

De asemenea, pipetele astupate cu dopuri de vată mai pot fi sterilizate într-un cilindru de metal cu capac, din care pot fi luate la nevoie.

4. Pipetele Pasteur se confecţionează din tuburi de sticlă de 20-30 cm lungime, spălate şi uscate. Se şlefuiesc ambele capete şi se astupă cu dopuri de vată, după care se sterilizează (sterilizare uscată) împachetate în hârtie de ambalaj, câte 50 până la 100 de bucăţi într-un pachet (Fig. 5).

Pentru obţinerea pipetei Pasteur se ţine mijlocul tubului într-o flacără puternică a unui bec de gaz, mai precis în porţiunea ei albastră. În timpul încălzirii, tubul se răsuceşte mereu, menţinându-l continuu în flacără. Când sticla s-a înmuiat suficient pentru a fi trasă şi se îndoaie uşor, se scoate tubul din flacără şi în acelaşi timp se trage de cele două capete. În

nici un caz nu se trag pipetele cât timp tubul este în flacără deoarece efilarea se face defectuos.

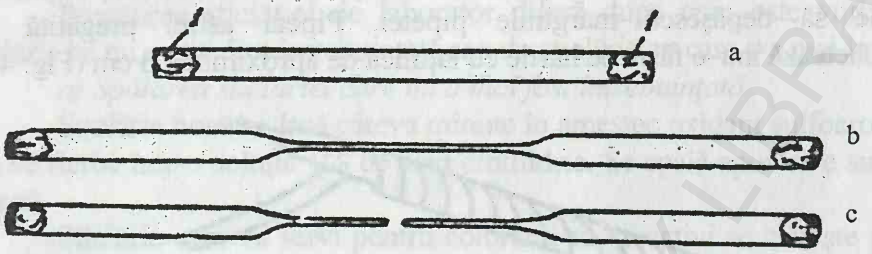


Fig. 5 – Executarea pipetelor Pasteur: a - tub de sticlă cu dopuri de vată (sterilizat);
b - tub de sticlă steril efilat la flacără;
c - pipete Pasteur după secționare și închidere la flacără.

După ce s-a obținut o bună subțiere a sticlei şi o lungime corespunzătoare a pipetelor, se introduce în flacără numai partea subțire a tubului pentru tăierea pipetelor. Capetele tăiate se mai țin câteva secunde în flacără pentru închidere prin sudare. O pipetă este bine executată atunci când subțierea se face treptat spre vârf. Pipetele Pasteur astfel pregătite se păstrează în vase conice cu partea subțire în sus.

5. Mojarele şi pipetele se împachetează separat pentru sterilizare.

1.3. MĂSURI SPECIFICE DE PROTECȚIA MUNCII ÎN LABORATORUL DE MICROBIOLOGIE

În laboratorul de microbiologie se impune respectarea anumitor norme de protecția muncii pentru a se evita, în primul rând, infecțiile accidentale de laborator, răspândirea materialului infectant, precum şi accidentele cauzate de executarea defectuoasă a unor operații de pregătire şi manipulare a materialelor. În principiu, se au în vedere următoarele reguli:

- lucrările de laborator se efectuează numai în prezența cadrului didactic şi numai de persoane instruite, echipate cu îmbrăcăminte de protecție corespunzătoare ce se poate spăla şi dezinfecta (halat, şorț, bonetă, iar pentru anumite lucrări mască şi mănuşi de cauciuc);
- nu se utilizează echipamentul din dotarea laboratorului fără aprobarea cadrului didactic şi nu se efectuează experiențe neautorizate;
- este interzisă joaca în laboratorul de microbiologie;

- nu se ţin şi nu se manipulează lichide inflamabile în apropierea surselor de flacără (becul de gaz);
- după executarea însămânţărilor este obligatorie sterilizarea imediată a pipetelor sau a anselor; ansele se sterilizează prin încălzire la roşu iar pipetele se introduc în recipientele ce conţin soluţie dezinfectantă (amestec sulfocromic, bicromat de potasiu 5%, sublimat coroziv 0,1%);
- eprubetele, plăcile Petri cu culturi microbiene etc. se adună numai în găleţi sanitare cu capac, se sterilizează prin autoclavare şi apoi se spală; **nu se scot din laborator materiale infectante** (în special culturi microbiene) fără aprobarea supraveghetorului;
- în laborator trebuie să se găsească în permanenţă prosoape curate şi săpun, precum şi vase cu soluţii antiseptice (apă oxigenată, alcool 70%);
- este interzis să se mănânce sau să se fumeze în încăperile unde se lucrează cu material infectant; **este interzisă introducerea alimentelor în laboratorul de microbiologie**; persoanele trebuie să se spele pe mâini după executarea lucrărilor şi apoi să se dezinfecteze cu alcool, iar când se impune, să realizeze o dezinfecţie mai severă, cu soluţie de biclorură de mercur 1‰ (sublimat coroziv).

În cazul când se produc contaminări accidentale în laborator, se recomandă păstrarea calmului şi se iau **măsuri de prim ajutor**:

- se anunţă imediat persoana care conduce lucrările practice de incidentul apărut;
- se acoperă zona infectată cu prosoape şi se toarnă deasupra soluţii dezinfectante; după 15 minute se îndepărtează şi se sterilizează materialele utilizate;
- dacă materialul infectant ajunge în gură, se elimină imediat, se clăteşte gura cu apă şi apoi se face gargară cu permanganat de potasiu 0,1%, apă oxigenată 1% sau soluţie de tinctură de iod (5 picături la un pahar de apă); apoi se clăteşte cu apă, repetându-se de mai multe ori, timp de câteva ore;
- în cazul când materialul infectant ajunge în ochi, se evită frecarea, se spală sacul conjunctival, de mai multe ori cu apă, apoi se fac instilări cu colire antiseptice sau unguente cu antibiotice;
- în cazul rănirilor produse de animale sau în urma manipulării neîndemânatice a unor instrumente, se lasă rana să sângereze

bine, se badijonează cu tinctură de iod sau se aplică pulberi, unguente, soluții de sulfamide sau antibiotice;

- în infecțiile accidentale mai periculoase, cu material ce conține agenții etiologici ai antraxului, tetanosului etc, rănile se cauterizează, cu precauție, cu acid azotic fumans şi apoi se apelează imediat la medic.

În afara pericolului infectării, personalul din laboratorul de microbiologie trebuie bine instruit în privința utilizării aparaturii (autoclav, centrifugă, agitator etc.) şi a substanțelor chimice. Pentru evitarea accidentelor, în dreptul aparatelor respective se vor afla afişate instrucțiunile de funcționare şi manipulare.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

2. STERILIZAREA

Prezența ubicuitară a microorganismelor în mediul extern, în cavitățile naturale, pe tegumentele şi mucoasele organismului uman şi animal impune anumite reguli pentru studierea lor.

Prima condiție necesară pentru a putea studia un microorganism este izolarea lui în cultură pură, pe medii artificiale.

Toate operațiile necesare studiului trebuie realizate în mod aseptic iar însămânțarea produselor în vederea izolării microorganismelor se face pe medii sterile.

Prin **sterilizare** înțelegem distrugerea tuturor microorganismelor dintr-un mediu sau de pe un obiect, atât sub forma lor vegetativă cât şi sub formă de spori.

Distrugerea microorganismelor poate fi obținută prin acțiunea agenților fizici sau chimici. La baza metodelor de sterilizare stă folosirea efectelor nocive ale acestor agenți. În alegerea unei metode de sterilizare trebuie să ținem seama de scopul urmărit şi de calitățile fizice şi chimice ale materialului supus sterilizării.

Sterilizarea poate fi realizată prin:

- ✓ **agenți fizici** - căldura, filtrarea, radiațiile ultraviolete, ultrasunetele etc;
- ✓ **agenți chimici** - substanțe cu acțiune antimicrobiană.

2.1. STERILIZAREA PRIN AGENȚI FIZICI

Unul dintre agenții fizici cu o largă utilizare în sterilizare este căldura, care realizează distrugerea formelor vegetative şi a sporilor prin degradarea proteinelor sau prin carbonizare. Pentru sterilizare se poate folosi atât căldura uscată cât şi căldura umedă.

2.1.1. Metode de sterilizare prin căldură uscată

Sterilizarea prin încălzire la roşu constă în încălzirea până la înroşire a obiectului de sterilizat în flacăra unui bec de gaz (Fig. 6). Procedeul este aplicabil numai la sterilizarea unor obiecte de metal: anse, spatule, ace de seringă etc.

Înainte de a le pune în contact cu produsul de însămânțat, obiectele trebuie lăsate să se răcească pentru a nu distruge microorganismele prezente în produsul de însămânțat.

Sterilizarea prin flambare se efectuează trecând rapid şi în mod repetat obiectul de sterilizat printr-o flacără. Procedeul este aplicabil numai la obiecte de dimensiuni mici şi cu suprafaţe netede, lipsite de asperităţi care ar putea proteja microorganismele (gâtul baloanelor şi eprubetelor, pipete, lame de sticlă etc.).

Fig. 6 – Sterilizarea ansei în flacăra unui bec de gaz

Sterilizarea la cuptorul cu aer cald (etuvă, cuptorul Pasteur, sterilizatorul Poupinel). Etuva (Fig. 7) este un aparat de formă cilindrică sau paralelipipedică prevăzut cu pereţi dubli de tablă între care circulă aer cald.

În interior, se găsesc rafturi de sită metalică pentru aşezarea obiectelor de sterilizat. La partea inferioară există o serie de rezistenţe electrice care constituie sursa de căldură iar în partea superioară un orificiu pentru termometrul ce indică temperatura din interiorul aparatului.

În cuptorul cu aer cald se sterilizează obiecte de sticlă, porţelan, hârtie, vată, instrumente metalice.

Pentru a se obţine o sterilizare perfectă este necesar să se menţină obiectele la temperatura de 180^0 C, timp de 60 minute.

Obiectele curate, perfect uscate şi împachetate sunt aşezate pe rafturi, la distanţă de pereţi pentru a se evita carbonizarea hârtiei sau a dopurilor de vată. Se închide ermetic aparatul şi se conectează rezistenţa la reţeaua de curent electric.

Aparatele sunt prevăzute cu un sistem de reglare şi menţinere constantă a temperaturii. Se urmăresc indicaţiile termometrului de control

iar după atingerea temperaturii de 180^0 C se menține o oră. Se închide apoi sursa de căldură şi se lasă aparatul să se răcească.

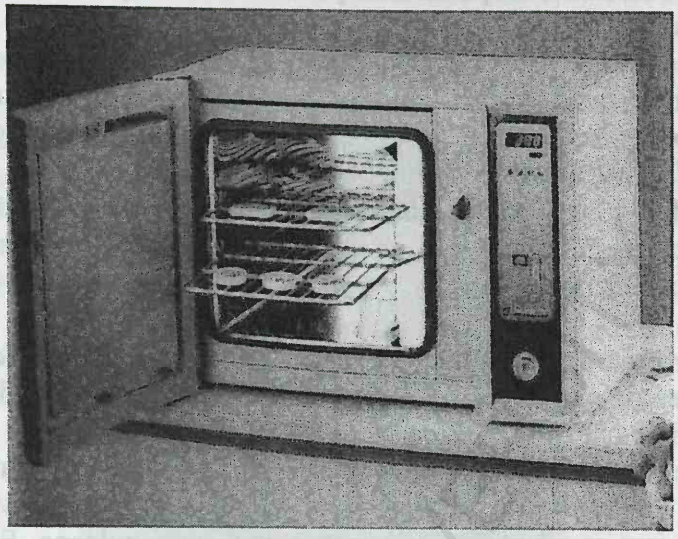


Fig. 7 – Etuvă termoreglabilă pentru sterilizare

Obiectele se scot numai când temperatura interioară a ajuns egală cu cea a mediului înconjurător. Deschiderea aparatului înainte de răcire duce la spargerea sticlăriei prin diferența bruscă de temperatură. În timpul sterilizării, hârtia şi vata capătă o culoare uşor gălbuie. În cazul în care temperatura depăşeşte 180^0 C, hârtia se carbonizează. Obiectele sterilizate în acest fel nu trebuie să fie folosite. Hârtia şi vata se descompun sub acțiunea căldurii şi degajă un gudron bogat în substanțe antiseptice a căror prezență împiedică dezvoltarea microorganismelor ce urmează să fie cultivate. Dacă s-a produs carbonizarea, obiectele de sticlă trebuie spălate cu alcool, apoi cu apă, uscate şi sterilizate din nou.

Pentru controlul sterilizării se foloseşte testul caramelizării zaharozei (la 170^0 C) conținută în tubuşoare de sticlă ce se aşază printre obiectele de sterilizat.

2.1.2. Metode de sterilizare prin căldură umedă

Căldura umedă permite o sterilizare eficace la o temperatură mult mai joasă decât cea necesară în cazul sterilizării cu aer cald, deoarece are o mare putere de penetrație, distrugând microorganismele într-un timp mai scurt.

Sterilizarea prin fierbere este procedeul folosit curent pentru sterilizarea instrumentelor metalice, seringilor etc. Obiectele se introduc în sterilizatoare electrice, în apă distilată pentru a nu se depune săruri în timpul fierberii şi sunt menţinute timp de 30 minute. Fierberea nu este o metodă de sterilizare completă, deoarece temperatura de 100^0 C sub formă de căldură umedă distruge doar formele vegetative, în timp ce unii spori rezistă. De aceea, fierberea se foloseşte atunci când nu se cer condiţii riguroase de sterilizare, iar obiectele trebuie întrebuinţate imediat.

Pentru a împiedica ruginirea instrumentelor şi totodată pentru a ridica punctul de fierbere al apei, se poate adăuga în apă borax sau carbonat de sodiu (Na_2CO_3) 4-5%.

Sterilizarea prin vapori de apă sub presiune (autoclavarea) se foloseşte pentru medii de cultură, materiale infecte, obiecte de cauciuc, filtre bacteriologice etc.

Acest mod de sterilizare se realizează cu ajutorul autoclavului (Fig. 8) care este format dintr-un recipient metalic cu pereţi dubli, prevăzut cu un capac greu care se adaptează prin intermediul unor buloane. Etanşeitatea este asigurată de o garnitură de azbest sau cauciuc. Aparatul este prevăzut cu o supapă de siguranţă, un robinet de vapori şi un manometru care indică presiunea în atmosfere: la **0,5 atm** se sterilizează mediile de cultură ce conţin hidraţi de carbon, la **1 atm** majoritatea mediilor de cultură, iar la **2 atm** materialele infecte).

În interior se găseşte un trepied înalt de câţiva centimetri pe care se pune un coş sau o găleată în care se aşază obiectele de sterilizat. Sursa de căldură poate fi reprezentată printr-o rezistenţă electrică sau prin becuri de gaz. Pe partea laterală, aparatul este prevăzut cu un tub de nivel pentru controlul volumului de apă din interior, o pâlnie de umplere a cazanului precum şi un robinet de golire. Pentru punerea în funcţiune a autoclavului, se introduce în aparat apă distilată până la nivelul indicat pe sticla de nivel. Coşul sau găleata cu obiecte de sterilizat, acoperit cu hârtie pentru a evita umezirea lor prin apa de condesare a vaporilor de pe capac, se aşază pe trepied. Se închide capacul cu ajutorul buloanelor prin strângerea a câte două aflate diametral opus; strângerea se face în două reprize. Se deschide robinetul de vapori şi se aprinde arzătorul cu gaz. Când apa începe să fiarbă, vaporii vor ieşi prin robinet, mai întâi într-un jet întrerupt, apoi continuu, şuierând. Este necesar să se scoată tot aerul din aparat, deoarece prezenţa lui falsifică indicaţiile manometrului. Se închide apoi robinetul de vapori şi din acest moment acul manometrului începe să indice creşterea presiunii. Când s-a realizat presiunea dorită, aceasta se menţine constantă

cât timp este necesar. Datorită puterii mari de penetrație a vaporilor, sunt suficiente 20-30 minute de sterilizare.

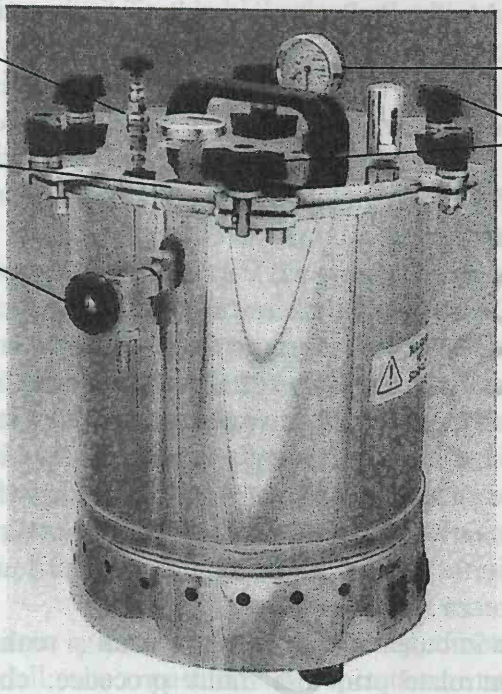


Fig. 8 – Autoclav

Presiunea folosită variază după calitatea materialului de sterilizat, pentru materialele obișnuite obținându-se o sterilizare completă (distrugerea formelor vegetative și a sporilor) la 0,5 – 2 atm, timp de 20-30 minute.

După trecerea timpului necesar pentru sterilizare, se stinge sursa de căldură. Când acul manometrului a coborât la zero, se deschide robinetul de vapori iar după evacuarea lor completă, se deschide capacul și se scot obiectele. Deschiderea aparatului înainte de scăderea completă a presiunii produce decompresiunea bruscă și proiectarea lichidelor din flacoane.

Deși sterilizarea mediilor de cultură cu ajutorul vaporilor este aparent simplă, ea prezintă o serie de inconveniente:

a) determină o denaturare a proteinelor și inactivarea unor enzime;

b) produce distrugerea unor vitamine și factori de creștere;

c) supraîncălzirea poate antrena polimerizarea unor compuși și brunificarea mediului. Aceste fenomene se datoresc:

- ♦ caramelizării zaharurilor;
- ♦ oxidării fenolilor și a acidului ascorbic;

♦ polimerizării aldehidelor nesaturate;

♦ reacțiilor chimice dintre grupările aldehidice ale glucidelor reducătoare cu grupările aminice ale aminoacizilor, polipeptidelor şi proteinelor (reacția Maillard). Produşii rezultați din reacția Maillard sunt toxici pentru numeroase microorganisme.

De aceea, în cazul mediilor complexe este necesară sterilizarea separată a glucidelor şi a substanțelor azotate şi apoi amestecarea lor sterilă în proporțiile cerute de rețetă în momentul utilizării. Sterilizarea acestora se face la autoclav (115^0 C, 20 minute) sau fracționat.

Există şi variante de autoclave care au cazanul de presiune în poziție orizontală (autoclav orizontal). Vaporii provin dintr-o sursă separată şi apoi sunt admişi în cazan. Aerul este îndepărtat printr-o pompă de vid, ceea ce asigură penetrația rapidă şi perfectă a vaporilor în porozitățile ambalajelor şi materialelor. După sterilizare, vaporii sunt îndepărtați rapid şi vidul astfel creat asigură uscarea perfectă a materialelor sterilizate.

Autoclavele orizontale cu prevacuum sunt indicate pentru sterilizarea materialelor chirurgicale şi permit uscarea perfectă şi rapidă a obiectelor. Absența aerului în timpul încălzirii elimină riscul degradării materialelor sub acțiunea oxigenului în condițiile căldurii umede. La aceste aparate nu se sterilizează soluții.

Funcționarea în bune condiții a autoclavului şi realizarea unei bune sterilizări pot fi controlate prin mai multe procedee: chimice, fizice şi biologice.

Testele chimice constau în utilizarea unor substanțe cu punct de topire cunoscut: benzonaftolul - 110^0 C, floarea de sulf - 114^0 C, rezorcina - 119^0 C, acidul benzoic - 121^0 C. Asemenea substanțe se introduc în tubuşoare de sticlă, închise la extremități, ce se aşază printre obiectele de sterilizat. Pentru a face vizibilă topirea substanței, se încorporează urme de coloranți (albastru de metilen, fucsină, violet de gențiană). Testele chimice ne ajută să verificăm dacă s-a realizat temperatura de sterilizare în interiorul autoclavului, dar au dezavantajul că nu indică şi timpul de acțiune al temperaturii. În practica sterilizării se foloseşte floare de sulf şi fucsină.

Testele fizice folosesc termometre cu mercur de 200^0 C aşezate cu rezervorul în interiorul aparatului şi cu tubul gradat la exterior pentru a se putea citi temperatura.

Testele biologice constau în folosirea unor culturi sporulate care rezistă la temperaturi ridicate (*Bacillus anthracis* ai cărui spori sunt distruşi la 118^0 C sau *Clostridium botulinum* la 125^0 C). Sterilizarea este eficientă dacă însămânțarea sporilor după autoclavare nu este urmată de dezvoltarea bacteriilor. În practică, se întrebuințează fire uscate de bumbac sau mătase,

îmbibate în prealabil în cultura sporulată şi închise într-un tub de sticlă steril. După sterilizare, se sparge tubul iar firele se însămânţează pe un mediu de cultură. Dacă după 48 ore mediul rămâne steril, sterilizarea a fost realizată în bune condiţii. Testele biologice sunt cele mai eficiente pentru că indică atât nivelul temperaturii cât şi timpul de acţiune asupra microorganismului testat.

Pasteurizarea, procedeu descris de Pasteur, este o metodă de sterilizare incompletă, aplicabilă substanţelor lichide, prin care se realizează doar distrugerea formelor vegetative, nu şi a sporilor. Pasteurizarea se poate face la temperatura de 60-65^0 C, timp de 30 minute. Aceasta este o *pasteurizare joasă*. Când temperatura folosită este de 70-75^0 C, timp de 10-20 minute, se realizează o *pasteurizare medie*. Când lichidele supuse pasteurizării sunt aduse într-un strat subţire în contact cu suprafeţe încălzite la 85-90^0 C, timp de câteva secunde, urmată de o răcire bruscă la 4^0 C, se realizează o *pasteurizare înaltă*. Pasteurizarea şi mai ales pasteurizarea înaltă se foloseşte curent în industria laptelui. Ea are drept scop distrugerea microbilor patogeni din lapte, fără a altera însă vitaminele şi valoarea alimentară.

Tindalizarea (sterilizarea fracţionată), metodă de sterilizare descrisă de Tyndall, este o pasteurizare repetată care se utilizează în cazul când substanţele de sterilizat au un grad mare de termolabilitate, distrugându-se printr-o încălzire la 120^0 C. Asemenea materiale sunt reprezentate de mediile de cultură cu hidraţi de carbon sau cu substanţe proteice macromoleculare (mediile cu ou, serul coagulat). Astfel, mediile cu zaharuri se tindalizează la 100^0 C, serul coagulat sau mediile cu ou la 70-80^0 C. Când materialele suportă temperatura de 100^0 C, tindalizarea se execută, de regulă, în autoclav. Pentru aceasta, capacul nu se strânge cu buloane, iar robinetul rămâne tot timpul deschis. Materialele se sterilizează în vapori de apă la presiune normală. În cazul când temperatura de 100^0 C nu este suportată de materialele respective, tindalizarea va fi făcută la temperatura corespunzătoare în băi de apă sau, în cazul mediilor de cultură care necesită şi un proces de coagulare, în aparate speciale numite coagulatoare.

Sterilizarea fracţionată constă în încălzirea la temperatura respectivă a materialelor de sterilizat timp de 30-60 minute, de trei ori consecutiv, la interval de 24 ore. Prin încălzire, în prima zi, se distrug formele vegetative ale bacteriilor, sporii rămânând viabili. După 24 ore de păstrare a mediilor la temperatura camerei, având condiţii favorabile, sporii vor germina. În urma germinării sporilor rezultă celulele vegetative care vor fi distruse de

încălzirea din ziua a doua. Tratamentul termic din ziua a treia se face cu scopul de a distruge şi eventualele celule vegetative rezultate din germinarea tardivă a unor spori. Acesta este, de fapt, o probă de control.

2.1.3. Filtrarea

Pentru sterilizarea substanţelor ce se modifică sub acţiunea căldurii (toxine bacteriene, lichide biologice, unele medii de cultură), se foloseşte filtrarea, metodă mecanică de sterilizare care constă în trecerea unui lichid printr-o substanţă poroasă care reţine microorganismele. Filtrarea nu este o metodă de sterilizare perfectă, deoarece virusurile şi chiar unele bacterii pot traversa pereţii filtrelor.

Mecanismul intim al filtrării este reprezentat de un întreg complex de fenomene fizico-chimice (capilaritate, tensiune superficială şi adeziune moleculară, diferenţe de sarcini electrice, vâscozitate etc.) şi nu se datoreşte unei acţiuni mecanice, de reţinere a bacteriilor în raport numai cu dimensiunile porilor materialului filtrant. De asemenea, natura lichidului de filtrat, temperatura şi pH-ul acestuia influenţează adeziunea lui la peretele porilor.

În lucrările de microbiologie se folosesc diferite tipuri de filtre, diferite prin materialul din care sunt confecţionate:

1. Plăcile filtrante de azbest pentru filtrul Seitz se notează cu EK, EK_2 şi EK_3, pentru a indica dimensiunile porilor. Filtrele EK_2 reţin bacteriile, iar filtrele EK_3 reţin şi virusurile mari.

2. Filtrele de sticlă, notate cu litera G, sunt de cinci dimensiuni (G_1 - G_5). Filtrele G_5 reţin bacteriile.

3. Membranele filtrante se pot confecţiona din diverse materiale cum sunt colodiul, celuloza, gelatina iar în ultimul timp din diferite mase plastice (Fig. 9).

Membranele filtrante se folosesc în special în virusologie şi în toate împrejurările în care sunt necesari pori foarte mici.

Filtrul Seitz (Fig. 10) se compune dintr-un cilindru metalic prevăzut la partea inferioară cu o rondelă de sită peste care se aşază membrana filtrantă. Aceasta se fixează etanş pe o pâlnie prin 3-6 şuruburi laterale. În interiorul cilindrului se toarnă lichidul de filtrat, iar prin tubul lateral al balonului Kitasato se face aspiraţia cu ajutorul unei pompe de vid.

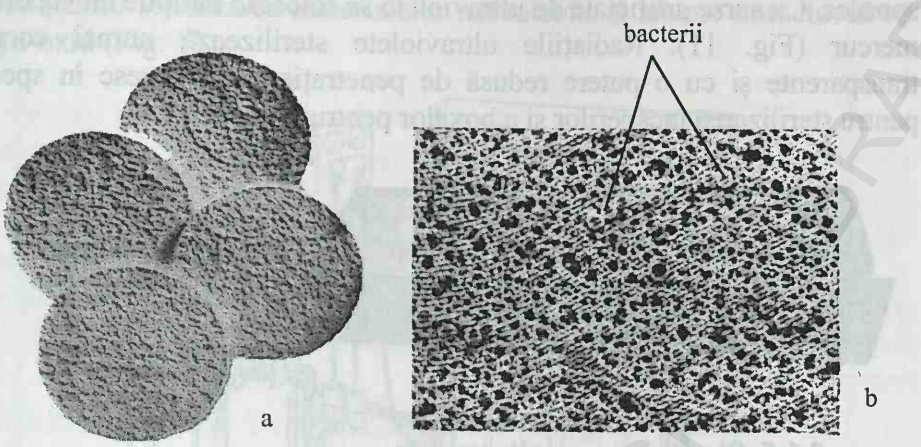


Fig. 9 – Membrane filtrante: a-vedere de ansamblu; b-imagine electronomicroscopică.

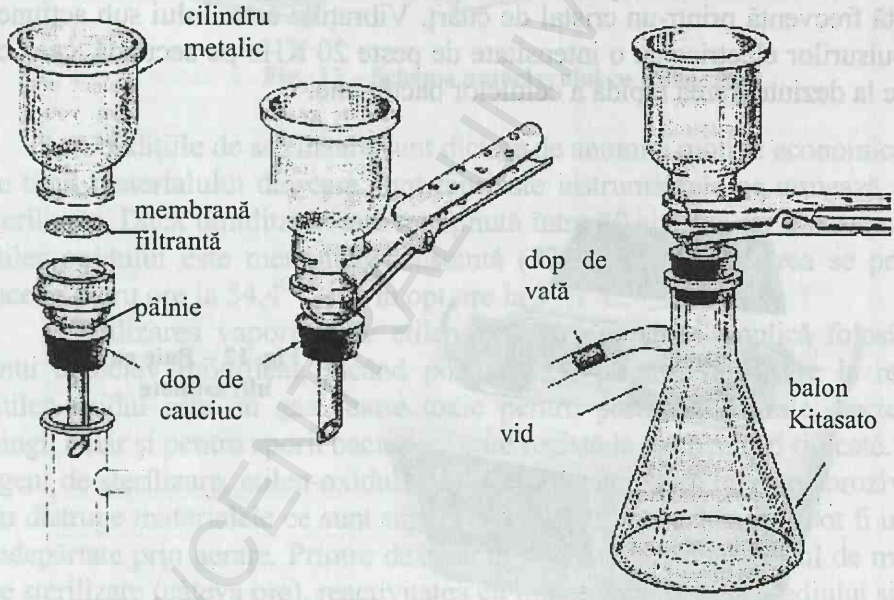


Fig. 10 – Filtru Seitz

2.1.4. Sterilizarea cu radiații ultraviolete

Radiațiile cu lungimi de undă între 2540 - 2800 Å au efectul bactericid cel mai puternic. Radiațiile ultraviolete sunt nocive pentru formele vegetative ale bacteriilor, având o acțiune mai redusă asupra

sporilor. Ca surse artificiale de ultraviolete se folosesc lămpile cu vapori de mercur (Fig. 11). Radiațiile ultraviolete sterilizează numai corpuri transparente şi cu o putere redusă de penetrație. Se folosesc în special pentru sterilizarea încăperilor şi a boxelor pentru lucru steril.

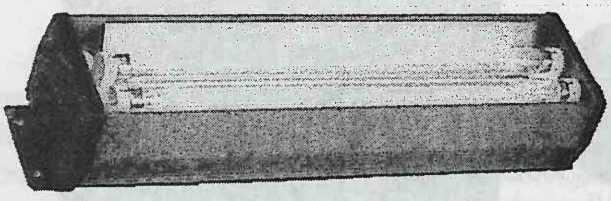


Fig. 11 – Lampă cu vapori de mercur

2.1.5. Sterilizarea cu ultrasunete

Ultrasunetele sunt vibrații acustice a căror frecvență depăşeşte cu mult limitele percepției acustice umane. Acest gen de vibrații se obțin în aparate speciale (Fig. 12), care permit trecerea unui curent alternativ de înaltă frecvență printr-un cristal de cuarț. Vibrațiile cristalului sub acțiunea impulsurilor electrice au o intensitate de peste 20 KHz pe secundă, ceea ce duce la dezintegrarea rapidă a celulelor bacteriene.

Fig. 12 – Baie cu ultrasunete

2.1.6. Sterilizarea cu etilen-oxid

Apariția în ultima perioadă a numeroase ustensile de laborator fabricate din materiale plastice (seringi, plăci Petri, eprubete, pungi, dispozitive filtrante etc.) a determinat dezvoltarea unui nou tip de autoclav

folosit pentru sterilizarea materialelor termolabile şi anume **autoclavul cu etilen-oxid** (Fig. 13).

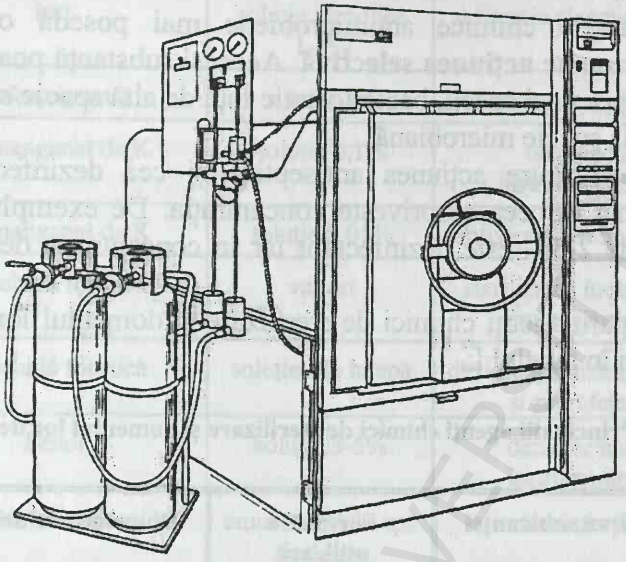


Fig. 13 – Schema autoclavului cu etilen-oxid

Condiţiile de sterilizare sunt dictate de anumite motive economice şi de tipul materialului din care sunt fabricate instrumentele ce urmează a fi sterilizate. Dacă umiditatea este menţinută între 20 şi 50%, iar concentraţia etilen-oxidului este menţinută constantă (720 mg/l), sterilizarea se poate face în patru ore la $54,4^0$ C sau în opt ore la $37,7^0$ C.

Utilizarea vaporilor de etilen-oxid sub presiune implică folosirea unui autoclav modificat, făcând posibilă aşa numita sterilizare la rece. Etilen-oxidul este un gaz foarte toxic pentru particulele virale, bacterii, fungi, chiar şi pentru sporii bacterieni care rezistă la temperaturi ridicate. Ca agent de sterilizare, etilen-oxidul este uşor de manipulat, nu este coroziv şi nu distruge materialele ce sunt supuse sterilizării, iar reziduurile pot fi uşor îndepărtate prin aerare. Printre dezavantaje amintim timpul destul de mare de sterilizare (câteva ore), reactivitatea cu unii componenţi ai mediului şi cu anumite tipuri de materiale plastice.

2.2. STERILIZAREA PRIN AGENŢI CHIMICI

Unele substanţe chimice cu acţiune antimicrobiană sunt utilizate fie pentru a împiedica dezvoltarea bacteriilor într-un mediu de cultură sau într-un lichid biologic, fie pentru distrugerea completă a tuturor bacteriilor.

În primul caz se vorbeşte de acţiune **bacteriostatică** sau **antiseptică**, în cel de-al doilea caz de acţiune **bactericidă** sau **dezinfectantă.**

Substanţele chimice antimicrobiene mai posedă o proprietate importantă şi anume **acţiunea selectivă.** Aceeaşi substanţă poate avea efect bactericid asupra unei specii, bacteriostatic faţă de altă specie sau indiferent faţă de o a treia specie microbiană.

Adeseori, între acţiunea antiseptică şi cea dezinfectantă există deosebiri numai în ceea ce priveşte concentraţia. De exemplu, fenolul în concentraţie de 2-5% este dezinfectant iar în concentraţie de 0,02-0,05% este antiseptic.

Principalii agenţi chimici de sterilizare şi domeniul lor de utilizare sunt prezentaţi în tabelul I:

Tabel I – Principalii agenţi chimici de sterilizare şi domeniul lor de utilizare

Denumirea substanţei	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Acid boric	soluţie 3-4%	antiseptic al mucoaselor
Acid sulfuric	soluţie 5%	dezinfecţia duşumelelor
Hidroxid de sodiu	soluţie 1-3%	dezinfecţia mobilierului
Alcool etilic	soluţie 70%	antiseptic al tegumentelor
Săruri ale metalelor grele Biclorură de mercur	soluţie 1%	dezinfecţia suprafeţelor şi a mâinilor
Oxiclorură de mercur	soluţie 1/6000	dezinfecţia instrumentarului
Azotat de argint	soluţie 1%	antiseptic pentru instilaţii conjunctivale
Substanţe oxidante Clor gazos	2-3 mg/l	potabilitatea apei
Hipoclorit de Na	0,5% clor activ	antiseptic al plăgilor
Hipoclorit de Na	25% clor activ	dezinfectant
Hipoclorit de K	25% clor activ	dezinfectant
Cloramină (25% clor activ)	suspensie 10-20%	dezinfectant

Denumirea substanței	Forma de utilizare	Domeniul de utilizare
Iod	soluție alcoolică 1-5%	antiseptic al tegumentelor
Apă oxigenată	soluție 3%	antiseptic al plăgilor
Permanganat de K	soluție 0,1%	dezinfecția instrumentarului
Permanganat de K	soluție 0,01%	antiseptic pentru gargară
Aldehidă formică	vapori	sterilizarea încăperilor, îmbrăcăminte
Aldehidă formică	soluție 5% în apă	dezinfecția instrumentelor și suprafețelor
Fenol	soluție 3-5%	dezinfectant al instrumentelor
Crezoli (metilfenoli)	emulsie 5% în apă fierbinte	dezinfecție
Creolina (crezoli activați cu săpun de gudron)	emulsie 5-10% în apă	dezinfecție
Hexaclorofen	soluție 1% în săpun	antiseptic al tegumentelor
Detergenți cationici (săruri de amoniu cuaternar)	soluție 0,1%	antiseptic al tegumentelor și plăgilor
Detergenți anionici (alchilarilbenzensulfonați)	soluții	agenți de spălare mecanică
Săpunuri de Na și K	soluții	agenți de spălare mecanică

3. MEDII DE CULTURĂ

3.1. DEFINIȚIE, CONDIȚII, CLASIFICARE

Microorganismele se pot dezvolta şi în afara mediului lor natural pe **medii de cultură artificiale,** care reprezintă substraturi nutritive (lichide sau solide, organice sau anorganice) ce pot asigura dezvoltarea şi multiplicarea lor. Mediile se folosesc pentru izolarea şi păstrarea sub formă de culturi pure a microorganismelor, precum şi pentru identificarea speciilor în funcție de proprietățile lor fiziologice. De aceea, ele trebuie să fie cât mai asemănătoare cu substraturile naturale.

Mediile de cultură trebuie să îndeplinească anumite condiții pentru ca specia microbiană să se poată dezvolta:

- ♦ să conțină substanțele necesare microorganismului precum şi ingredientele care condiționează creşterea sa;
- ♦ substanțele trebuie să corespundă indicațiilor tehnice (cristalizate sau nu, anhidre sau cu un anumit număr de molecule de apă, preparate de anumite firme etc.), să fie cântărite exact şi să fie introduse în recipient în ordinea strict indicată;
- ♦ să aibă gradul de alcalinitate sau aciditate (pH) corespunzător dezvoltării microorganismului respectiv şi să-i asigure menținerea în limite compatibile cu creşterea lui (prin sisteme tampon);
- ♦ să fie stabil adică să-şi păstreze toate calitățile inițiale pe toată durata incubării;
- ♦ sterilizarea nu trebuie să altereze mediul; acesta trebuie să rămână steril până în momentul însămânțării;
- ♦ să asigure condițiile de aerobioză/anaerobioză corespunzătoare microorganismului respectiv;
- ♦ să fie repartizate în recipiente care să împiedice contaminarea culturii care se dezvoltă în ele, atât înainte cât şi după însămânțare;
- ♦ să asigure un anumit grad de umiditate.

3.2. CLASIFICAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

Diversitatea extremă a compoziției chimice a mediilor nutritive nu permite o clasificare propriu-zisă, deoarece suprapunerile apar foarte frecvent. Criteriile de clasificare sunt următoarele:

A. După proveniență:

1. Medii naturale:

- ♦ de origine vegetală: must de malț (pentru levuri), cartof glicerinat etc.;
- ♦ de origine animală: lapte, bilă etc.;

2. Medii artificiale:

- ♦ lichide: bulionul, apa peptonată;
- ♦ solide: geloza, gelatina.

B. După compoziție:

1. Medii uzuale (*simple*): folosite în mod curent în laborator, pentru cultivarea unui număr mare de microorganisme (bulionul, apa peptonată, geloza, gelatina);

2. Medii complexe (compuse): folosite pentru izolarea și creșterea unor microorganisme care se dezvoltă slab sau nu se dezvoltă pe medii simple (bulion-ser, bulion-sânge, bulion glucozat, geloză-ser, geloză-sânge).

3. Medii speciale: prin compoziția lor permit creșterea preferențială a anumitor specii dintr-un amestec heterogen de microorganisme (dintr-o probă naturală) sau evidențierea anumitor caractere particulare de metabolism ale microorganismului cultivat. Aceste medii conțin: un indicator de pH, un zahar fermentescibil, antiseptice selective, antibiotice.

Pot fi clasificate în:

- ➢ **medii de îmbogățire**, capabile să favorizeze dezvoltarea anumitor specii microbiene aflate în concentrații mici în produse cu floră asociată (ex. mediile Müller - Kauffman, Leifson, Chapman solid etc.);
- ➢ **medii selective** - sunt medii ce conțin substanțe bacteriostatice care inhibă creșterea unor specii saprofite sau patogene și substanțe ce favorizează dezvoltarea anumitor specii (ex. mediile Istrati-Meitert, Wilson-Blair, Kristensen, Löewenstein, Jennon, Levine, Endo, bulion-bilă cu lactoză și verde brilliant);
- ➢ **medii elective** - medii fără substanțe bacteriostatice, a căror compoziție oferă condiții de dezvoltare unor specii care cresc mai rapid decât flora de asociație (ex. mediile Löeffler, Bordet-Gengou);

- **medii diferențiale (de identificare)** - sunt medii ce conțin indicatori pentru punerea în evidentă a unor procese biochimice caracteristice pentru metabolismul unor specii (fermentarea zaharurilor, capacitatea de oxido-reducere, utilizarea acidului citric ca unică sursă de carbon etc.); ex. - mediile Fergussen, Clark-Lubs, Hins, Drigalski, Konsen-Simmons, bulion cu roşu neutru;
- **medii de conservare** - sunt medii folosite pentru menținerea viabilității culturilor (ex. mediul Dorset, agarul moale).

3.3. PREPARAREA MEDIILOR DE CULTURĂ

3.3.1. Prepararea mediilor simple

Pentru numeroase medii de cultură, substanța nutritivă de bază o constituie maceratul de carne. În practica modernă însă, laboratoarele au posibilitatea de a obține produse standard (extracte de carne produse de firmele Merck sau Difco), care permit prepararea rapidă a mediilor.

Bulionul de carne

Bulionul de carne reprezintă mediul de bază în microbiologie. Prepararea lui se poate realiza în două moduri:

- pentru prepararea bulionului din extract de carne (Beef Extract Difco), la 1000 ml apă distilată se adaugă 3 g extract, 10 g peptonă şi 5 g NaCl.
- dacă se foloseşte produsul Nutrient Broth, la 1000 ml apă distilată se adaugă 8 g nutrient, 5 g peptonă şi 5 g NaCl.

Substanțele se dizolvă prin încălzire, se corectează pH-ul mediului cu o soluție de NaOH 10% sau HCl 10% până la valorile 7,2 - 7,6, se repartizează în recipiente (Fig. 14) şi se sterilizează prin autoclavare, 30 minute la o 121^0 C.

Apa peptonată

În 1000 ml apă distilată se dizolvă la cald, 10 g peptonă şi 5 g NaCl. Se corectează pH-ul la 7,8; se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în tuburi şi se sterilizează 20 minute la 121^0 C.

Peptonele întrebuințate în microbiologie sunt substanțe care rezultă din digestia peptică a cărnii. Ele au o compoziție complexă şi conțin, printre altele, albumoze, polipeptide şi peptone, deosebit de necesare metabolismului bacterian. Compoziția lor variază după țesutul şi specia

animală care serveşte drept materie primă. O proprietate importantă este legată de faptul că nu coagulează la căldură.

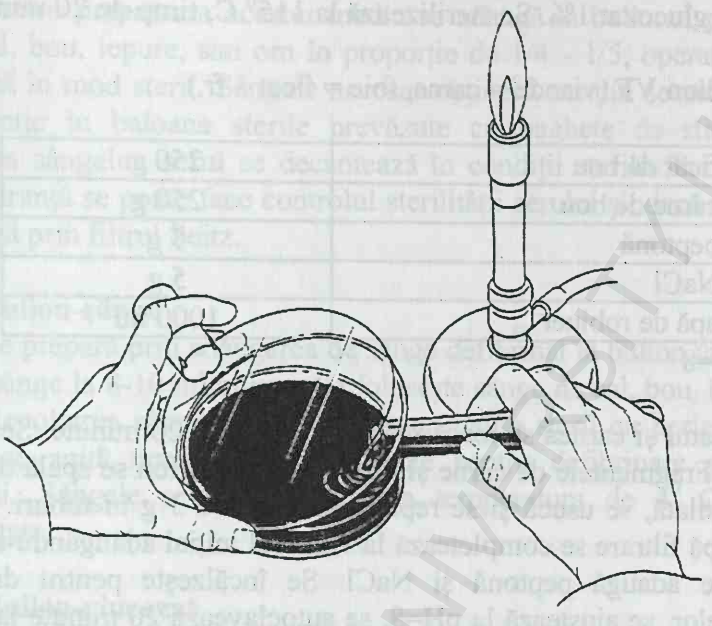


Fig. 14 – Repartizarea mediului de cultură în placa Petri

Medii uzuale pentru cultivarea bacteriilor anaerobe

Geloza Veillon

bulion simplu	1000 ml
agar	8-10 g
glucoză	5-10 g
KNO_3	1-2 g

Se dizolvă glucoza şi azotatul de potasiu în bulion, se adaugă agarul, se încălzeşte la autoclav, se filtrează prin vată, se repartizează în tuburi Weinberg, astfel ca mediul să ocupe mai mult de jumătate din înălţimea tubului. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 15 minute. Pentru solidificarea mediului, tubul se menţine în poziţie verticală.

Bulion cu ficat (bulion Tarozzi)

Se fierbe ficatul (de cal, bou, cobai, iepure), se taie în fragmente de formă paralelipipedică. Se introduc în tuburi cu 8-10 ml bulion simplu sau bulion glucozat 1%. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 20 minute.

Bulion VF (viande = carne, foie = ficat – fr.)

ficat de bou	250 g
carne de bou	250 g
peptonă	5 g
NaCl	5 g
apă de robinet	1000 ml

pH=8

Ficatul şi carnea se toacă mărunt şi se fierb 20 minute. Se filtrează prin tifon. Fragmentele de carne şi ficat rămase în tifon se spală de 4-5 ori cu apă distilată, se usucă şi se repartizează câte 1-3 g în tuburi. Lichidul obținut după filtrare se completează la volumul inițial adăugându-se apă de robinet. Se adaugă peptonă şi NaCl. Se încălzeşte pentru dizolvarea ingredientelor, se ajustează la pH=8, se autoclavează 20 minute la 121^0 C, se adaugă glucoză 2% şi se filtrează prin hârtie de filtru. Mediul obținut se repartizează aproximativ câte 6 ml în tuburile în care s-au pus în prealabil 3 g carne cu ficat. Se poate pune la suprafață un strat de ulei de parafină. Se sterilizează timp de 15 minute la 115^0 C sau prin tindalizare la 100^0 C, timp de 30 minute, 3 zile consecutiv.

Mediu cu tioglicolat

extract de drojdii bacto	5 g
hidrolizat tipic de cazeină	15 g
dextroză	5 g
NaCl	2,5 g
L-cisteină	0,75 g
acid tioglicolic	0,3 ml
agar	0,75 g
resazurină	0,001 g
apă distilată	1000 ml

pH=7,1

3.3.2. Prepararea mediilor complexe

Bulion-ser

Pentru prepararea acestui mediu se adaugă la bulionul propriu-zis ser de cal, bou, iepure, sau om în proporție de 1/4 - 1/5, operație care se efectuează în mod steril. Sângele necesar obținerii serului se recoltează în mod aseptic în baloane sterile prevăzute cu baghete de sticlă. După coagularea sângelui, serul se decantează în condiții sterile. Pentru o mai mare siguranță se poate face controlul sterilității serului și, dacă este cazul, se filtrează prin filtrul Seitz.

Bulion-sânge

Se prepară prin adăugarea de sânge defibrinat la bulion în proporție de 1 ml sânge la 8-10 ml bulion. Se folosește sânge de cal, bou, berbec sau iepure. Recoltarea sângelui se face într-un balon steril cu perle de sticlă. Balonul se agită timp de 10-15 minute pentru defibrinare și evitarea coagulării. Sângele se poate păstra la temperatura de 4^0 C până la întrebuințare.

Bulion-glucozat

Se prepară pornind de la bulionul propriu-zis, la care se adaugă glucoză în proporție de 0,5 - 1%. Sterilizarea se face prin tindalizare, la 100^0 C, în 3 zile consecutiv.

Geloză-ser

Pentru prepararea gelozei cu ser, aceasta trebuie în prealabil topită, apoi se lasă să se răcească la 45^0 C. Se folosește sânge de cal, bou, berbec, 30 minute. Se adaugă ser în proporție de 1/5, se omogenizează, apoi se lasă să se solidifice în poziția dorită. Controlul sterilității se poate face prin păstrarea la termostat timp de 24 ore.

Geloză-sânge

La geloza lichefiată și răcită la $45\text{-}50^0$ C se adaugă sânge defibrinat de oaie sau de om, în proporție de 1 ml sânge la 9 ml mediu, agitându-se ușor pentru omogenizare. Geloza se repartizează fie în tuburi care se înclină, fie în plăci Petri.

3.3.3. Prepararea mediilor speciale

3.3.3.1. Medii de îmbogățire

Mediul OCST (bulion-ou-cisteină-ser-telurit)

ser normal de bou	150 ml
bulion glucozat 2‰	50 ml
telurit de potasiu 2%	20 ml
cisteină 1%	2,2 ml
gălbenușuri de ou	2 buc.

Se folosesc ouă proaspete, se spală bine cu apă și săpun și se țin 30 minute în alcool 70^0, după care se usucă pe hârtie de filtru sterilă, apoi cu un tampon de vată cu tinctură de iod se șterge unul din capetele oului și se deschide cu o foarfecă și pensă sterilă. Se scurge albușul, iar gălbenușul se recoltează într-un balon steril cu perle de sticlă. Verificarea sterilității se poate face prin însămânțarea pe medii de cultură, urmând ca prepararea mediului să se facă după 24 ore. După omogenizare, gălbenușurile se amestecă cu ingredientele și mediul se repartizează în tuburi, câte 3-4 ml. Mediul se folosește pentru izolarea bacililor difterici și mai ales pentru diagnosticul purtătorilor de bacili.

Mediul cu selenit de sodiu (Leifson)

biselenit de sodiu anhidru	2 g
lactoză	2 g
peptonă	2,5 g
Na_2HPO_4	2,5 g
NaH_2PO_4	2,5 g
apă distilată	500 ml

pH= 7

Se dizolvă cantitatea de biselenit de sodiu în 100 ml apă distilată și se sterilizează la 100^0 C, timp de 30 minute. Aceasta este soluția I. Celelalte ingrediente se dizolvă în 400 ml apă distilată (soluția II). Sterilizarea este identică. Soluția I are aspect limpede, fiind incoloră. Soluția II prezintă un precipitat, din care cauză se lasă 24 ore la temperatura camerei, apoi se decantează peste soluția I. pH-ul trebuie să aibă valoarea 7. Mediul se folosește la izolarea salmonelelor.

Mediul Chapman lichid

extract de carne	4 g
peptonă Witte	10 g
NaCl	150 g
lactoză	15 g
apă distilată	1000 ml

pH=7,6

Soluția de lactoză se prepară separat, în 100-150 ml apă distilată. Celelalte substanțe se dizolvă, toate, la cald în restul de apă distilată, se corectează pH-ul la 7,6. Se autoclavează 30 minute la 121^0 C. Se filtrează prin hârtie de filtru şi se adaugă soluția de lactoză. Se repartizează în eprubete sterile şi se autoclavează la 115^0 C, timp de 20 minute. Datorită concentrației ridicate de NaCl, mediul inhibă flora de asociație, permițând dezvoltarea stafilococilor patogeni, rezistenți la concentrația respectivă.

3.3.3.2. Medii selective

Mediul cu bilă uscată (Istrate-Meitert)

geloză nutritivă	100 ml
lactoză	1,5 g
bilă de bou uscată la 105°C	0,8 g
citrat de sodiu	0,8 g
tiosulfat de sodiu	0,8 g
citrat de fier	0,2 g
soluție de albastru de bromtimol	4 ml

pH=7,3-7,4.

Indicatorul se prepară astfel: se dizolvă 1 g albumină de bromtimol în 25 ml NaOH n/10 după care se adaugă 475 ml apă distilată.

La geloza nutritivă lichefiată se adaugă restul ingredientelor şi se încălzeşte la 80°C până la completa lor dizolvare. Se ajustează pH-ul la 7,3-7,4. Mediul se fierbe apoi 15 minute la baia de apă, se lasă să se răcească la 55^0 C şi se toarnă în plăci Petri. Pe acest mediu care neînsămânțat este de culoare verde, coloniile de *Salmonella* apar albastru-verzui, cele de *Escherichia coli* galbene şi cele de *Proteus* albastru-verzui cu centrul mai opac.

Mediul Levine (EMB-eosină, albastru de metilen, GEAM-geloză, eosină, albastru de metilen)

peptonă	10 g
K_2HPO_4	2 g
eozină, soluție 2%	2 ml
albastru de metilen, soluție 0,5%	1,3 ml
lactoză	1 g
agar	20 g
apă distilată	1000 ml

pH=7,4

Se fierbe până la completa dizolvare a ingredientelor. Se filtrează prin hârtie de filtru sau vată. După răcire, mediul se aduce la volumul inițial cu apă distilată, pH-ul trebuie să fie 7,4. Se repartizează în baloane de 100 ml şi se sterilizează la 121^0 C, 30 minute. În momentul întrebuințării se topeşte geloza pe baia de apă şi după răcire la 50^0 C se adaugă la 100 ml mediu, 5 ml soluție sterilă de lactoză 20% (sterilizată la 115^0 C, 20 minute), 2 ml soluție apoasă de eozină galbenă 2% şi 1,3 ml soluție apoasă de albastru de metilen 0,5%. Eozina şi albastrul de metilen se sterilizează în prealabil. După omogenizare, mediul se toarnă în cutii Petri.

Mediul EMB are culoarea roşie violacee şi se foloseşte pentru analiza microbiologică a apei. Coloniile de *Escherichia coli* apar negricioase cu luciu metalic caracteristic.

Mediul Löewenstein

asparagină	3 g
KH_2PO_4	1 g
citrat de sodiu	1 g
$MgSO_4$	1 g
glicerină neutră	60 ml
apă distilată	1000 ml

După dizolvarea substanțelor, amestecul se sterilizează la 100^0 C în autoclav cu capacul deschis timp de 2 ore, apoi se închide capacul şi se continuă sterilizarea la 115^0 C, timp de 15 minute. Aceasta reprezintă soluția mamă care se poate păstra timp îndelungat la rece.

Pentru pregătirea mediului propriu-zis se amestecă într-un balon cu perle de sticlă 150 ml soluție mamă cu 12 ml glicerină neutră și 6 g făină de cartofi. După omogenizare se încălzește mai întâi la 100^0 C, timp de 15 minute, apoi la 56^0 C, timp de 60 minute.

În continuare, se spală 5 ouă, apoi se țin 30 minute într-o baie de alcool 70^0 și se lasă să se usuce pe o hârtie de filtru sterilă. După uscare, unul din capete se badijonează cu tinctură de iod și se deschide cu o foarfecă sterilă. Conținutul a 4 ouă și gălbenușul celui de-al cincilea se transvazează într-un pahar și se amestecă cu o baghetă sterilă, după care se adaugă în mediul încălzit la 56^0 C. În final, se mai adaugă 5 ml dintr-o soluție apoasă sterilă de roșu de Congo sau verde malachit 2%. Mediul se filtrează prin tifon steril, se repartizează în tuburi (6-7 ml), se coagulează pe baie de nisip la 80^0 C timp de 30 minute și se sterilizează prin tindalizare la $80\text{-}85^0$ C timp de 30 minute, în două zile consecutiv.

Mediul Löewenstein se folosește în vederea izolării și cultivării bacilului tuberculos.

Mediul cu bulion-lactozat, bilă și verde brilliant

peptonă	10 g
lactoză	10 g
apă distilată	1000 ml

pH=7,4

Se adaugă apoi 20 g bilă deshidratată de bou, care, în prealabil, a fost dizolvată în 200 ml apă distilată. Soluția de bilă trebuie să aibă pH-ul 7,0 - 7,5. Volumul mediului se adaugă la circa 975 ml, prin adăugarea de apă distilată. Se aduce pH-ul la 7,4 și se adaugă 13,3 ml soluție verde brilliant 0,1% în apă distilată. Se completează volumul la 1000 ml apă distilată după care se filtrează prin vată. Se repartizează câte 5 ml în eprubete sterile cu tuburi de fermentare Durham și se sterilizează în autoclav la 115^0 C, timp de 30 minute.

3.3.3.3. Medii elective

Mediul Löeffler

bulion glucozat 1%	100 ml
ser normal de bou (steril)	300 g

Se stabileşte pH-ul bulionului la 7,6 se amestecă bine cu serul şi se repartizează steril câte 5-7 ml în tuburi, apoi se coagulează la baie de nisip la 85-90^0 C timp de 30 minute. Pe acest mediu, bacilul difteric se dezvoltă în 8-16 ore, pe când flora de asociaţie abia după 22-24 ore.

Mediul Bordet-Gengou

cartofi	1000 g
glicerină	80 ml
NaCl	5 g
agar pulbere (bacto)	40 g
apă distilată	200 ml

Cartofii se curăţă şi se taie mărunt. Se toarnă apa distilată care conţine glicerină. După sterilizare la autoclav timp de 20 minute la 121^0 C se filtrează prin vată până ce se obţine un lichid foarte clar. Se amestecă apoi părţi egale de macerat de cartofi şi apă distilată glicerinată şi se adaugă clorura de sodiu şi agarul, a cărui topire se face prin fierbere. După repartizarea în tuburi, mediul se sterilizează la 100^0 C timp de 30 minute. Înainte de însămânţare se adaugă 25-30% sânge defibrinat, recoltat steril, de om sau de berbec. Pentru inhibarea florei asociate se recomandă să se adauge mediului de cultură 15-20 unităţi de penicilină pe ml. Mediul Bordet-Gengou se utilizează pentru cultivarea agentului tusei convulsive (*Bordetella pertussis*).

3.3.3.4. Medii diferenţiale

Mediul Drigalski

bulion de carne	1000 ml
peptonă	10 g
NaCl	5 g
lactoză	15 g
turnesol soluţie 10%	60 ml
agar	20 g

Ingredientele se dizolvă la cald. Se ajustează pH-ul la 7,4. Se autoclavează la 115^0 C, timp de 20 minute. Se filtrează prin hârtie de filtru. După repartizarea în eprubete se sterilizează din nou la 115^0 C timp de 20 minute. Mediul are culoare violet deschis şi se foloseşte pentru diferenţierea

genurilor *Escherichia* şi *Salmonella*. Coloniile de *Salmonella* produc virarea culorii în albastru, iar cele de *Escherichia* în roşu.

Mediul Koser şi Simmons

NaCl	5 g
$MgSO_4$	0,2 g
$(NH_4)_3PO_4$	1 g
citrat de sodiu	2 g
apă distilată	1000 ml

Se însămânţează cu ansa foarte puţin inocul. Speciile microbiene care folosesc citratul de sodiu ca unică sursă de carbon vor creşte, tulburând uniform mediul; adăugând agarul şi albastru de bromtimol, ca indicator, se obţine mediul solid Simmons.

Bulion cu roşu neutru

Într-un tub cu bulion se adaugă 1-2 picături roşu neutru, soluţie apoasă 2% sterilă. După însămânţare şi termostatare, se constată reducerea roşului neutru în foarte scurt timp. Dacă bacteriile au proprietăţi reducătoare slabe, se toarnă un strat de parafină lichidă la suprafaţa mediului, pentru ca reducerea să nu fie anihilată prin oxidare în contact cu aerul.

3.3.3.5. Medii de conservare

Mediul Dorset

Se folosesc ouă spălate cu apă şi săpun. După spălare, se introduc într-o soluţie fenicată 5% sau în alcool pentru dezinfectare, apoi se scot pe o hârtie de filtru sterilă. Capetele oului se trec prin flacără apoi se deschid în condiţii de sterilitate lăsând conţinutul să curgă într-un cilindru gradat steril. Se adaugă apă distilată sterilă în proporţie de 10% sau ser fiziologic în proporţie de 1 : 3 şi se omogenizează cu o baghetă sterilă. Se filtrează prin hârtie de filtru şi se repartizează în tuburi sterile. Sterilizarea se face prin tindalizare, la baia de nisip.

Acest mediu se întrebuinţează pentru creşterea bacilului tuberculos sau pentru păstrarea tulpinilor bacteriene în laborator.

Agarul moale

Este un mediu care se prepară asemănător gelozei, dar cantitatea de agar este de numai 2-5 g la 1000 ml bulion. Se foloseşte pentru cultivarea şi conservarea bacteriilor.

3.3.4. Medii folosite pentru izolarea actinomicetelor

Mediul Martin cu roz Bengal

peptonă	5 g
glucoză	10 g
K_2HPO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
roz Bengal	0,33 g
agar	18 g
apă distilată	1000 ml

pH = 7,0

Mediul Gauze

KNO_3	1 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4$	0,5 g
$FeSO_4$	0,01 g
amidon	20 g
agar	18 g
apă distilată	1000 ml

pH = 7,0

3.3.5. Medii folosite pentru dezvoltarea levurilor

Mediul cu extract de malț (lichid)

extract de malț	20 g
apă distilată	1000 ml

pH = 5,6. Sterilizare 15 minute la 121^0 C.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Mediul cu extract de malț (solid)

extract de malț	20 g
agar	15 g
apă distilată	1000 ml

pH = 5,6. Sterilizare 15 minute la 121^0 C.

Mediul Sabouraud

peptonă	10 g
glucoză	20 g
agar	15 g
apă distilată	1000 ml

pH = 6-6,3. Sterilizare 20 minute la 121^0 C.

Mediul glucoză-extract de drojdie

extract de drojdie	5 g
glucoză	20 g
agar	20 g
apă distilată	1000 ml

Sterilizare 20 minute la 115^0 C. pH-ul se corectează la valoarea 4 cu acid tartric sau citric, în momentul utilizării, la 50^0 C.

Must de bere sau must de struguri-geloză

Aceste medii sunt utilizate în principal în industriile berii şi vinului. Sunt musturi deproteinizate prin încălzire la 120^0 C, apoi filtrate şi solidificate cu agar.

Mediul PDA (Potatoes-Dextrose-Agar)

extract de cartof	4 g
glucoză	20 g
agar	15 g
apă distilată	1000 ml

Sterilizare 15 minute la 121^0 C. După răcirea mediului la 50^0 C se corectează pH-ul la 3,5 cu acid clorhidric diluat, acid fosforic sau acid

tartric 10%. Incubare - 3-5 zile. Acest mediu este cel mai utilizat pentru numărarea drojdiilor din produsele alimentare.

3.3.6. Medii folosite pentru cultivarea micromicetelor

Mediul cu amidon şi agar

amidon solubil	40 g
extract de levuri	5 g
agar	20 g
apă distilată	1000 ml

Ingredientele se dizolvă la cald (fierbere). Mediul se repartizează şi se autoclavează la 121^0 C, timp de 15 minute.

Mediul cu cartof şi agar

cartofi	200 g
NaCl	1 g
agar	20 g
apă distilată	1000 ml

Cartofii se curăţă şi se fierb în 500 ml apă de robinet. Se sfărâmă şi se filtrează prin tifon sau vată. Se adaugă celelalte ingrediente şi se dizolvă. Se repartizează şi se sterilizează la 121^0 C, timp de 20 minute.

Mediul Czapek-Dox

Este un mediu standard pentru cultivarea speciilor din genurile *Aspergillus* şi *Penicillium*.

$NaNO_3$	2 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,5 g
KCl	0,5 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,01 g
glucoză (sau alt zahar)	30 g
agar	15-20 g
apă distilată	1000 ml

Se dizolvă toate componentele cu excepția fosfatului, în 500 ml apă. Fosfatul se dizolvă separat şi se adaugă la restul soluției. Se completează volumul cu apă până la un litru.

pH-ul mediului trebuie să fie 5,6. Sterilizarea se face timp de 20 minute la 115^0 C.

Pentru obținerea de fructificații sau în scopul observării lor directe se foloseşte apa agarizată preparată astfel:

agar	18 g
apă distilată	1000 ml

pH=5-6

3.4. DETERMINAREA pH-ULUI MEDIILOR DE CULTURĂ

pH-ul unei soluții este definit valoric ca logaritmul zecimal cu semnul schimbat al concentrației ionilor de H^+.

Metode de determinare a pH-ului

Pentru determinarea pH-ului mediilor nutritive se folosesc două tipuri de metode:

1 – metode colorimetrice;
2 – metoda electrometrică.

Metode colorimetrice

Metoda indicatorilor colorați se bazează pe proprietatea unei substanțe (indicator) de a-şi schimba culoarea în funcție de pH-ul soluției în care sunt dizolvate. Un colorant cu formula moleculară XH, în mediu alcalin cedează ionul de H^+ şi devine X^-; colorantul XH are o culoare iar după disociere, radicalul X^- altă culoare. Trecerea se face printr-un fenomen de tautomerie, cu apariția unor grupări cromofore.

Hârtia indicatoare de pH. Principiul utilizării sale este acelaşi ca şi pentru indicatorii colorați. Benzile de hârtie de filtru sunt impregnate cu indicatori de diferite culori; este suficient contactul dintre banda de hârtie şi soluția al cărei pH urmează a fi determinat. Culoarea indicatorului se schimbă, iar nuanța obținută este comparată cu eşantioanele colorate care însoțesc banda şi care au nuanțe diferite pentru fiecare valoare a pH-ului pe care o cuprinde.

Citirea culorii hârtiei indicatoare se realizează într-un interval de 15-30 secunde de contact cu picătura de soluție care se depune pe hârtia indicatoare. Aceasta poate fi de un spectru larg – acoperind toată scara de pH (0-14), dar erorile de lucru sunt mari, sau poate fi de un spectru limitat, pentru 1-2 unități de pH, eroarea de lucru fiind mult diminuată.

Indicatori de pH

Indicatorii de pH, sau acido bazici, sunt coloranți organici, acizi slabi sau baze, a căror culoare depinde de concentrația ionilor de H^+ sau OH^-, respectiv de pH. Modificarea culorii indicatorilor în funcție de pH se explică, după Kolthoff, printr-o modificare de structură care are loc odată cu modificarea gradului de disociere a indicatorului în funcție de variația concentrației ionilor de hidrogen. Rezultă de aici că forma nedisociată a indicatorului are altă culoare și structură decât forma ionizată. De exemplu, fenolftaleina, în stare nedisociată are o structură lactoidă și este incoloră. Odată cu creșterea concentrației (OH^-) peste o anumită limită, trece în forma chinoidă, disociată, de culoare roșie. Metiloranjul, în stare nedisociată are o structură azoidă, de culoare galbenă; pe măsura creșterii concentrației (H^+) peste o anumită limită trece în forma chinoidă, disociată, de culoare roșie.

Modificarea culorii indicatorului nu se produce la un anumit pH, ci într-un anumit interval de pH. Se numește deci interval de viraj, intervalul de pH în afara căruia nu se mai observă o schimbare a culorii indicatorului (Tabel II).

Orice indicator trebuie să îndeplinească anumite condiții și anume:

1. să funcționeze reversibil;
2. schimbarea de culoare să se producă brusc, deci într-un interval de pH cât mai redus;
3. să fie suficient de solubil în apă, pentru ca soluția să fie suficient de colorată;
4. să aibă o putere de colorare suficientă, astfel încât culoarea să fie ușor observată, chiar pentru concentrații reduse de indicator (10^{-4}, 10^{-5} M);
5. schimbarea de culoare să se producă la adăugarea unor cantități mici de acizi sau baze, respectiv consumul acestora trebuie să fie atât de redus, încât să nu aducă erori de titrare;
6. să fie stabil în soluție, în condițiile obișnuite de lucru, apă, lumină, oxigen, CO_2.

Tabel II – Indicatorii cei mai utilizaţi şi modul lor de întrebuinţare

Indicatorul	Interval de viraj al pH-ului	Culoare		Cantitate de indicator pentru 10 ml soluţie
		Acid	Alcalin	
Albastru timol (A) (sare de sodiu)*	1,2-2,8	roşu	galben	1-2 picături soluţie 0,1% în apă, sau în alcool 20%
Tropeolină 00 (B)	1,3-3,2	roşu	galben	1 picătură soluţie 1% în apă
1-4 Dinitrofenol (A)	2,4-4,0	incolor	galben	1-2 picături soluţie 0,1% în alcool 50%
Galben-metil (B) (galben dimetil)	2,9-4,0	roşu	galben	1 picătură soluţie 0,1%
Metiloranj (B)	3,1-4,4	roşu	galben-portocaliu	1 picătură soluţie 0,1 % în apă
Albastru de bromfenol (A) (sare de sodiu)	3,0-4,6	galben	albastru-violet	1 picătură soluţie 1% în apă sau în alcool 20%
Alizarin sulfonat de sodiu (A)	3,7-5,2	galben	violet	1 picătură soluţie 0,1% în apă
Verde de bromcrezol (A) (sare de sodiu)	4,0-5,6	galben	albastru	1 picătură soluţie 0,1% în apă
Roşu de metil (A) (sare de sodiu)	5,2-6,8	roşu	galben	1 picătură soluţie 0,1% în apă
Purpură de bromcrezol (A) (sare de sodiu)	4,4-6,2	galben	purpuriu	1 picătură soluţie 0,1% în apă
p-Nitrofenol (A)	5,0-7,0	incolor	galben	1-5 picături soluţie 0,1% în apă
Albastru de bromtimol (A) (sare de sodiu)	6,2-7,0	galben	albastru	1 picătură soluţie 1% în apă sau în alcool 20%
Azolitmin (A) (turnesol lacmus)	5,0-8,0	roşu	albastru	5 picături soluţie 0,5% în apă
Roşu fenol (A) (sare de sodiu)	6,4-8,0	galben	roşu	1 picătură soluţie 1% în apă sau în alcool 20%

Indicatorul	Interval de viraj al pH-ului	Culoare		Cantitate de indicator pentru 10 ml soluție
		Acid	Alcalin	
Roșu neutral (B)	6,8-8,0	roșu	galben	1 picătură soluție 0,1% în alcool 70%
Acid rozolic (A)	6,8-8,0	galben	roșu	1 picătură soluție 0,1% în alcool 90%
Roșu crezol (A) (sare de sodiu)	7,2-8,8	galben	roșu	1 picătură soluție 1% în apă sau în alcool 20%
α – Naftolftaleină (A)	7,3-8,7	roz	verde	1-5 picături soluție 0,1% în alcool 70%
Tropeolină 100 (B)	7,6-8,9	galben	roz-roșu	1 picătură soluție 0,1% în apă
Albastru timol (A) (sare de sodiu)**	8,0-9,6	galben	albastru	1-5 picături soluție 0,1% în apă sau în alcool 20%
Fenolftaleină (A)	8,0-10,0	incolor	roșu	1-5 picături soluție 0,1% în apă sau alcool 70%
Timolftaleină (A)	9,4-10,6	incolor	albastru	1 picătură soluție 0,1% în apă
Galben de alizarină (A)	10,0-12,0	galben	liliachiu	1 picătură soluție 0,1% în apă
Tropeolină 0 (B)	11,0-13,0	galben	portocaliu-brun	1 picătură soluție 0,1% în apă
Nitromină (B)	11,0-13,0	incolor	portocaliu-brun	1-2 picături soluție 0,1% în alcool 70%

A – indicator acid;
B – indicator bazic;
* - pentru domeniu acid;
** - pentru domeniu bazic.

După cum se observă, unii indicatori sunt incolori (fenolftaleina, timolftaleina, nitramina etc.), alții sunt bicolori. Sunt și indicatori tricolori, care au două intervale de viraj ca albastru-timol (1,2-2,8 – roșu-galben, pentru domeniul acid și 8,0-9,6 – galben-albastru, pentru domeniul bazic).

Metoda electrometrică

Metoda electrometrică de determinare a pH-ului este relativ rapidă și foarte precisă (indică cu trei zecimale diferența de tensiune

dintre cei doi electrozi, care se află în soluția al cărei pH se măsoară și, respectiv în soluția standard), necesitând utilizarea unui aparat special numit pH-metru (Fig. 15). Acesta este de fapt un voltmetru, care permite măsurarea unei diferențe de potențial electric.

Fig. 15 – pH-metru electronic

pH-metrul înregistrează diferențele de potențial care sunt generate de diferențe ale concentrației ionilor de H^+, între un electrod de referință, care se află plasat într-o soluție cu pH cunoscut și un electrod de măsurare pentru pH-ul probei.

Electrozii de referință folosiți cei mai adesea sunt: electrodul de calomel saturat și electrodul de Ag-AgCl. Electrodul de măsurare a concentrației ionilor de H^+ este fie electrodul de H, de antimoniu, fie cel mai adesea, electrodul de sticlă. În ultimul timp, firmele specializate produc electrozi de sticlă combinați, care încorporează pe un suport unic, atât electrodul de referință cât și pe cel de măsurare. Electrodul de sticlă face parte din clasa electrozilor de membrană.

Principiul de funcționare al electrodului concentric de sticlă este următorul: o peliculă fină de sticlă specială separă două soluții de pH diferit; diferența de pH dintre cele două soluții stabilește o diferență de potențial electric; cele două soluții diferite sunt: soluția tampon (tampon ftalat acid de potasiu, tampon fosfat etc.), în care se găsește electrodul de referință și soluția al cărei pH urmează a fi determinat.

Electrodul este o membrană de sticlă specială format din lanțuri de atomi de Si și O. Cationii metalelor alcaline și alcalino-teroase ocupă golurile din această rețea.

La suprafața de contact dintre membrana de sticlă și soluție, sub influența moleculelor de apă, cationii metalici părăsesc rețeaua și trec în soluție, fiind înlocuiți cu ioni de H^+ din mediu. Ionii de H^+ hidratați din

soluție, transportă și un număr de molecule de apă, ceea ce duce la o "umflare" a suprafeței membranei.

Deoarece funcționarea electrodului de sticlă se bazează pe pătrunderea apei în rețeaua structurală a sticlei și pe trecerea în soluție a componentelor solubile, durata sa de funcționare este limitată. Odată cu trecerea în soluție, în structura membranei de sticlă, predomină scheletul rigid al atomilor de Si și O și rezistența electrică a electrodului crește.

Electrodul de înregistrare, concentric cu cel de referință, este inclus în soluția saturată (3 M) de KCl și comunică cu soluția al cărei pH se măsoară, printr-un mic orificiu. KCl are rolul de a face legătura între cei doi electrozi (Fig. 16).

Folosirea pH-metrului este simplă, dar impune respectarea unor condiții de lucru:

- trecerea unui interval de timp între momentul contactului electrodului cu soluția căreia i se măsoară pH-ul și momentul înregistrării;
- spălarea riguroasă a electrodului, înainte și după utilizare, ținând seama de fragilitatea membranei de sticlă a electrodului de referință;
- electrodul nu rămâne în soluția al cărei pH se determină, mai mult decât timpul necesar măsurării;

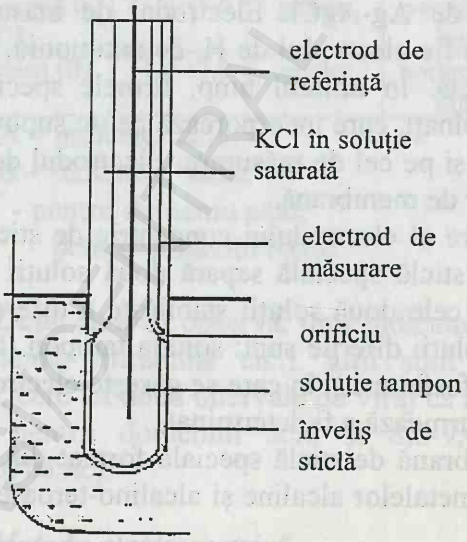


Fig. 16 – Schema electrodului concentric de sticlă

- între două determinări de pH pentru două soluții diferite se lasă un interval de timp;

- electrozii se păstrează uscați în cazul unei nefolosiri îndelungate, în caz contrar se păstrează în soluție de KCl;
- se verifică permanent nivelul KCl din electrodul de înregistrare;
- înainte de utilizare, electrozii noi se scufundă în HCl 0,1 N, 4-6 ore;
- nu se măsoară pH-ul unei soluții în care se formează precipitat sau care conține concentrații mari de proteine; astfel se riscă astuparea orificiului de comunicare al electrodului de KCl cu soluția căreia îi măsurăm pH-ul;
- nu se măsoară pH-ul soluțiilor cărora dorim să le păstrăm constantă concentrația de K^+ și Cl^-, pentru că ionii din electrod trec în soluție.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

4. ÎNSĂMÂNȚAREA MEDIILOR DE CULTURĂ OBȚINEREA CULTURILOR PURE CULTURI ȘI COLONII MICROBIENE

4.1. TEHNICI DE ÎNSĂMÂNȚARE

Însămânțarea constă în depunerea pe suprafața sau în profunzimea mediilor de cultură a microorganismelor din produsele patologice sau din alte surse (apă, sol etc).

Instrumentele folosite pentru efectuarea unei însămânțări sunt **ansele de însămânțare, pipetele Pasteur** sau **pipetele gradate.** Ansele sunt formate dintr-un fir de platină îndoit sub formă de buclă la o extremitate, montat pe un mâner de metal sau ebonită (Fig. 17).

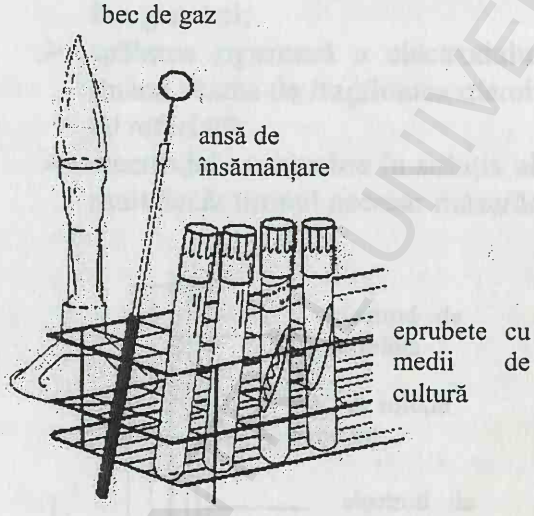


Fig. 17 – Materiale necesare însămânțării unei culturi microbiene

Operațiunea de însămânțare trebuie făcută cu toate precauțiile de asepsie, folosind medii de cultură și instrumente sterile, numai sub protecția unei flăcări, pentru a se evita introducerea în mediile de cultură a altor microorganisme decât cele prezente în produsul însămânțat. Deschiderea recipientelor în care se găsesc mediile și produsul de însămânțat se face cu mare atenție, în apropierea unei flăcări; gura recipientelor se flambează. De asemenea, trebuie sterilizate ansa sau pipeta cu care se efectuează însămânțarea atât înainte cât și după această operațiune. După sterilizare, este necesar ca ansa sau pipeta să fie lăsate să se răcească înainte de a le pune în contact cu produsul de însămânțat, deoarece temperatura ridicată distruge microorganismele.

Pentru realizarea condițiilor de asepsie, însămânțarea se face în încăperi lipsite de curenți de aer (sau chiar în boxe sterile), persoana nu vorbește, poartă bonetă, eventual și mască.

Conduita unei însămânțări (Fig. 18) este următoarea:

♦ instrumentul cu care se face însămânțarea se ține în mâna dreaptă cât mai aproape de extremitatea opusă celei care se introduce în recipient și se sterilizează în flacără; ansa se ține ca un creion iar pipetele se țin între degetul mare și mijlociu cu arătătorul aplicat pe orificiul prevăzut cu dopul de vată (Fig. 18-1);

♦ recipientul din care se prelevă sau în care urmează a fi depus materialul manipulat se ține de extremitatea inferioară în mâna stângă în așa fel încât conținutul și traiectul instrumentului să poată fi permanent controlat cu vederea;

♦ se scoate dopul recipientului cuprinzându-l între degetul mic și palma mâinii drepte; cât timp recipientele sunt fără dop se vor menține înclinate pentru a evita depunerea în interiorul lor a particulelor de praf sau a microorganismelor din atmosferă (Fig. 18-2);

♦ se sterilizează prin flambare gâtul și gura recipientului prin rotirea în flacără timp de câteva secunde;

♦ se introduce instrumentul de însămânțare și se face prelevarea materialului după care se retrage cu grijă pentru a evita atingerea pereților, flambându-se apoi gura și gâtul recipientului (Fig. 18-3, 18-4, 18-5);

♦ se lasă jos recipientul cu produs și se ia tot cu mâna stângă recipientul în care se face însămânțarea, deschizându-l în mod asemănător;

♦ se depune materialul de însămânțat în recipientul respectiv (eprubetă sau placă Petri) – Fig. 18-6;

♦ după terminarea operației se sterilizează ansa fără a se introduce direct bucla în flacără, căci urmele de lichid pot intra brusc în fierbere, stropind și contaminând suprafața din jur. Ansa se trece de mai multe ori prin flacără până când bucla și toată lungimea firului se înroșesc. Pipetele se introduc în cilindrul pentru pipete infecte; ele nu se flambează (Fig. 18-7).

Când recipientul cu produs și cel în care se face însămânțarea sunt eprubete, acestea se pot ține odată în mâna stângă, deschizându-le simultan (Fig. 18-8). Celelalte operații sunt identice.

Însămânțarea mediilor lichide

Dintr-o cultură sau dintr-un produs lichid se iau cu ajutorul pipetei Pasteur câteva picături care sunt introduse apoi, cu precauțiile expuse mai sus, în profunzimea mediului lichid.

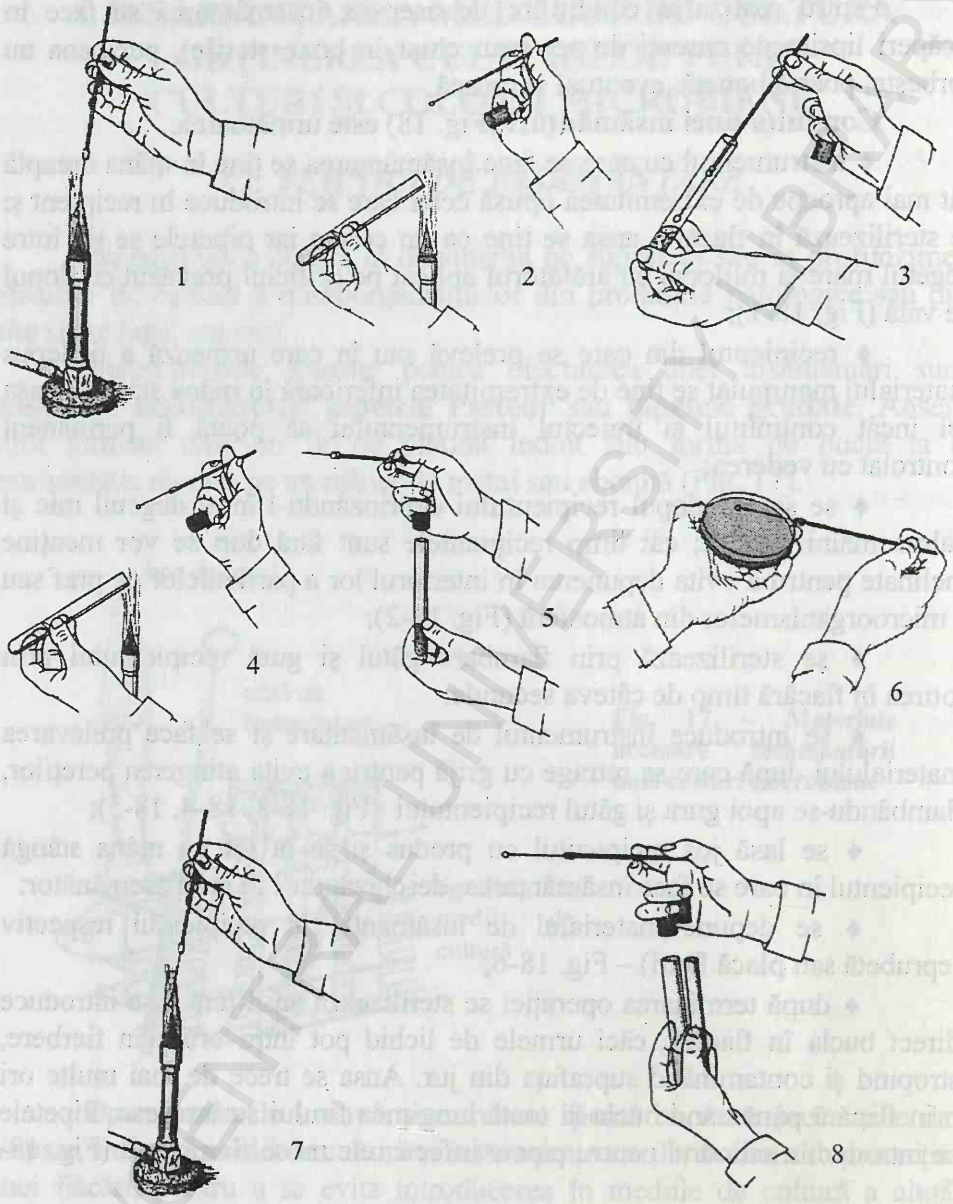


Fig. 18 – Tehnica însămânțării unei culturi microbiene cu ajutorul ansei

În cazul în care produsul de însămânțat este o cultură microbiană pe mediu solid sau un produs semisolid, se ia cu ansa o cantitate mică din acesta și se suspensionează în mediul de cultură, omogenizând amestecul cu ansa pe peretele tubului.

BCU MS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Însămânțarea pe suprafața mediilor solide

Atunci când trebuie însămânțat un produs sau o cultură din mediu lichid, se ia cu o pipetă Pasteur sau cu ansa o picătură din produsul respectiv, după care acesta se disemineză pe suprafața mediului de cultură din eprubete sau din cutiile Petri. Însămânțarea se poate face fie cu ansa descriind striuri (Fig. 19), fie cu o pipetă, prin înclinarea tubului sau a plăcii cu mediu în așa fel încât produsul să fie repartizat pe toată suprafața mediului.

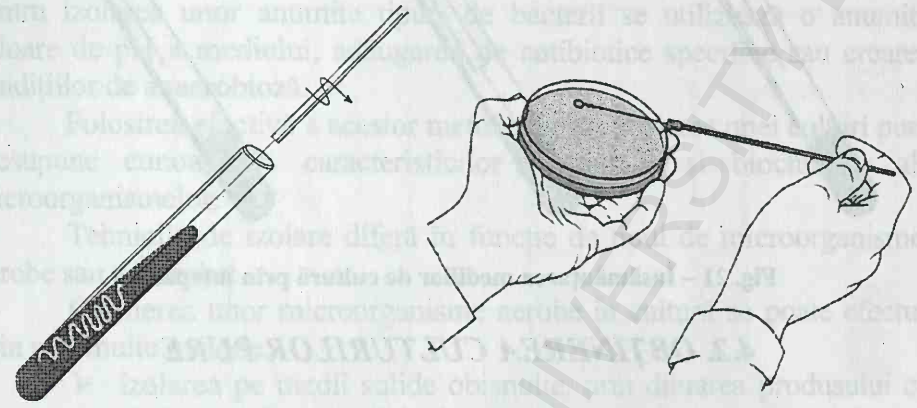


Fig. 19 – Însămânțarea prin descriere de striuri la suprafața mediilor solide

Însămânțarea în profunzimea mediilor solide

Însămânțarea în profunzimea mediilor solide se face prin încorporare sau prin înțepare.

Pentru însămânțarea prin încorporare, mediile (geloză, gelatină) se topesc în baia de apă și se răcesc la 45^0 C. Se introduce apoi o cantitate din produsul de însămânțat. Se omogenizează amestecul prin rularea tuburilor (eprubetelor) între palme, fără a se produce bule de gaz, după care mediile însămânțate sunt lăsate să se solidifice (Fig. 20).

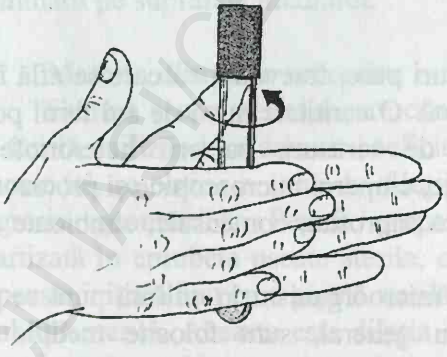


Fig. 20 – Omogenizarea amestecului prin rularea tubului între palme

Însămânțarea prin înțepare se efectuează cu ajutorul firului ansei după ce a fost încărcat cu produs (Fig. 21).

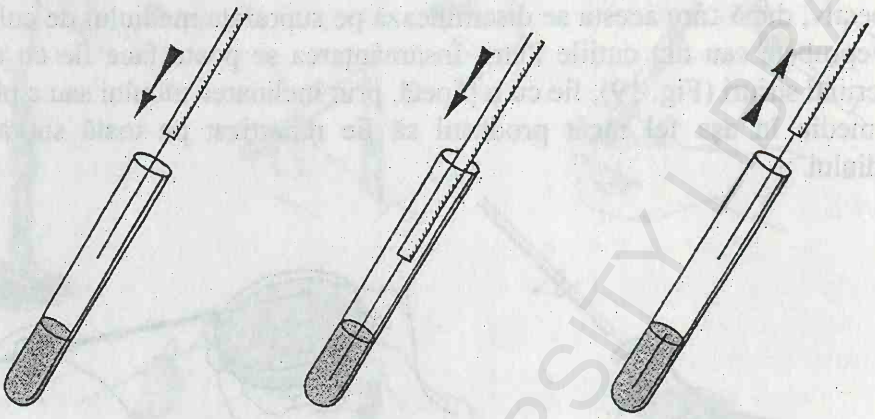


Fig. 21 – Însămânțarea mediilor de cultură prin înțepare

4.2. OBȚINEREA CULTURILOR PURE

O cultură pură conține o singură specie sau tulpină microbiană. Numai cu o cultură pură sunt posibile următoarele studii:

- morfologice (forma și mărimea celulelor);
- de cultură (caracteristicile de creștere ale culturii pe diferite medii);
- fiziologice și biochimice;
- de patogenitate (proprietatea microorganismelor de a produce boli la plante sau animale);
- serologice (studiul antigenelor celulare și a anticorpilor serici);
- genetice (variabilitatea, sexualitatea);
- bacteriofagi specifici.

Deși în natură se găsesc culturi pure, frecvența cu care se află într-un mediu este considerată foarte mică. O cantitate mică de sol fertil poate conține o varietate considerabilă de virusuri, bacterii heterotrofe și autotrofe, multe specii de drojdii, alge, ciuperci microscopice și protozoare. Aceste microorganisme pot exista ca saprofite, comensale, simbionte sau antagoniste.

Pentru izolarea unui anumit microorganism în cultură pură se pot folosi tipuri speciale de medii. În general, sunt folosite mediile de îmbogățire, selective sau diferențiale.

Agenții de îmbogățire și de selecție pot fi de natură chimică sau fizică.

Pentru izolarea microorganismelor termofile, mediul însămânțat se incubează la o temperatură ridicată (50^0 C sau mai mare).

Pentru izolarea microorganismelor halofile se adaugă în mediu NaCl 10%; pentru izolarea bacteriilor osmofile se adaugă o soluție concentrată de zaharoză. Multe bacterii plasmolizează în asemenea medii, în timp ce bacteriile halofile sau osmofile nu sunt afectate. De asemenea, pentru izolarea unor anumite tipuri de bacterii se utilizează o anumită valoare de pH a mediului, adăugarea de antibiotice specifice sau crearea condițiilor de anaerobioză.

Folosirea efectivă a acestor metode pentru izolarea unei culturi pure presupune cunoașterea caracteristicilor fiziologice și biochimice ale microorganismelor.

Tehnicile de izolare diferă în funcție de tipul de microorganisme: aerobe sau anaerobe.

Obținerea unor microorganisme aerobe în cultură se poate efectua prin mai multe metode:

- izolarea pe medii solide obișnuite, prin diluarea produsului cu obținerea de colonii izolate, pornind de la considerentul că o colonie provine din multiplicarea unei celule bacteriene;
- izolarea prin însămânțări pe medii speciale de cultură, favorabile dezvoltării numai a anumitor specii microbiene;
- izolarea bazată pe diferențele de comportare a bacteriilor față de agenți fizici, chimici și biologici;
- izolarea prin metode biologice, folosind animale de laborator.

4.2.1. Izolarea pe medii solide

Se realizează prin metoda diluțiilor succesive și prin metoda diseminării pe suprafața mediului.

Metoda diluțiilor succesive

Cultura sau materialul care conține microorganisme este diluată în apă sterilă, utilizând un anumit coeficient de diluare, de obicei egal cu 10. În acest fel, se obține o serie de diluții în care numărul celulelor scade în progresie geometrică. Pentru prepararea diluțiilor, apa sterilă este repartizată în eprubete uscate sterile, câte 9 ml în fiecare. Apoi 1 ml din suspensia inițială luat cu o pipetă sterilă este transferat în prima eprubetă cu 9 ml apă sterilă. Aceasta este diluția 1/10 (10^{-1}). Suspensia obținută este amestecată foarte bine cu ajutorul pipetei prin barbotare, ceea ce asigură o

bună omogenizare a suspensiei și se reduce aderarea celulelor de pereții eprubetei și pipetei. Apoi, cu aceeași pipetă se ia 1 ml din diluția 1/10 (10^{-1}) și se transferă în a doua eprubetă; se obține astfel diluția 1/100 (10^{-2}). În același mod se pregătesc și următoarele diluții: 1/1 000 (10^{-3}), 1/10 000 (10^{-4}), 1/100 000 (10^{-5}) etc. Din ultimele tuburi de diluție se fac însămânțări pe geloza turnată în tuburi sau în plăci Petri (Fig. 22).

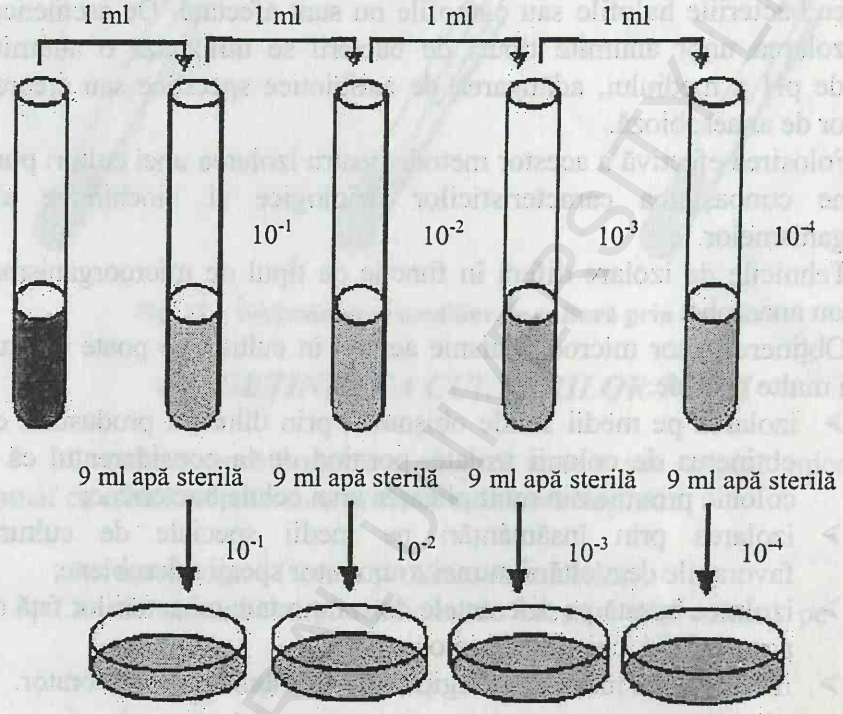


Fig. 22 – Tehnica executării diluțiilor seriate zecimale

Diluarea produsului poate fi făcută și direct în tuburi cu gelatină sau geloză topită și răcită la 45^0 C, care după aceea este turnată în plăci Petri. În fine, diluțiile se mai pot realiza prin treceri succesive în lichidul de condensare a mai multor tuburi cu geloză înclinată, cu răspândirea ulterioară a acestuia pe toată suprafața mediului de cultură din fiecare tub, prin mișcări de înclinare a acestora.

După incubare, coloniile izolate dezvoltate pe suprafața gelozei vor fi trecute cu ansa în tuburi.

Metoda diseminării pe suprafața mediului

Diseminarea se poate face pe suprafața gelozei înclinată în tuburi sau turnată în plăci.

În primul caz, se încarcă ansa cu produsul respectiv, se însămânțează în zig-zag pe 3-4 tuburi succesive, fără a reîncărca ansa, până la epuizarea produsului.

În cel de al doilea caz, după încărcarea ansei, se însămânțează în striuri mai multe plăci, tot până la epuizarea produsului de pe ansă (Fig. 23).

După incubarea la temperatura corespunzătoare micro-organismului pe care dorim să-l izolăm, se observă că în primele tuburi sau pe primele striuri din plăci, coloniile sunt confluente, dar în ultimele tuburi sau striuri coloniile sunt izolate, putând fi repicate și trecute mai departe în cultură pură.

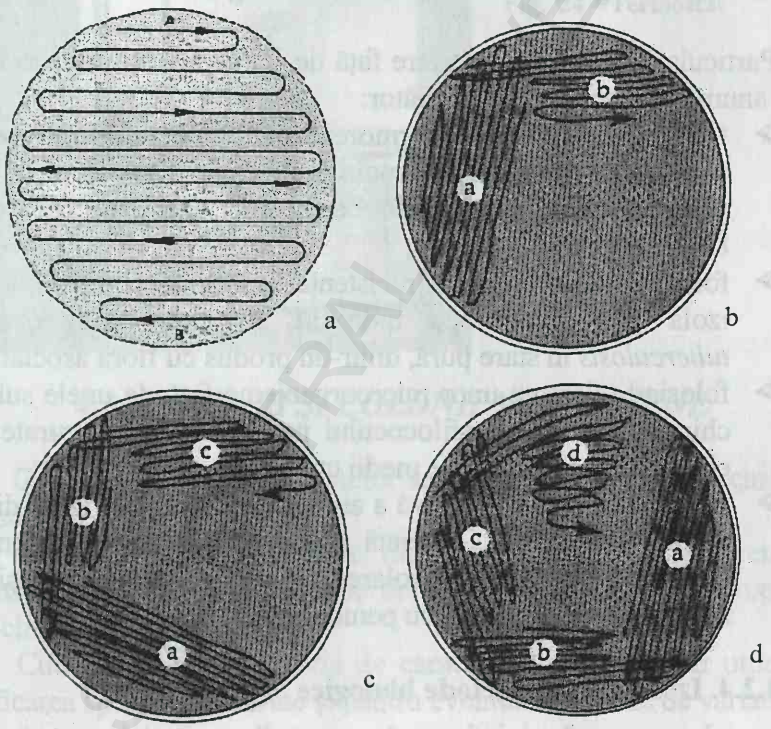


Fig. 23 – Tehnica obținerii de colonii izolate prin epuizarea produsului de pe ansă: a-epuizare continuă; b, c, d-epuizare în mai multe faze.

4.2.2. Izolarea pe medii speciale

Există medii de cultură care, datorită compoziției lor speciale, evidențiază anumite caracteristici metabolice ale unor microorganisme, ceea ce permite separarea speciilor între ele. Astfel, folosirea mediilor diferențiale conținând lactoză sau lactoză și zaharoză alături de un indicator colorat, permite diferențierea germenilor din genul *Escherichia*, capabili să fermenteze lactoza și zaharoza, de cei din grupul *Salmonella* care nu fermentează aceste zaharuri. De asemenea, folosirea mediilor cu substanțe bacteriostatice, permite izolarea unor specii patogene din produsele cu floră asociată, izolarea bacilului difteric pe medii cu telurit de potasiu, izolarea salmonelelor pe mediul Wilson-Blair sau a shigelelor pe medii cu săruri biliare.

4.2.3. Izolarea bazată pe particularitățile de comportare ale bacteriilor față de agenții fizici, chimici și biologici

Particularitățile de comportare față de acești agenți pot servi pentru izolarea anumitor specii în felul următor:

- folosind diferențele de termorezistență (separarea enterococului rezistent la 60^0 C de alți coci Gram-pozitivi sensibili la această temperatură sau separarea bacteriilor sporulate rezistente la 80^0 C de cele nesporulate;
- folosind diferențele de rezistență la agenți chimici, se poate izola prin tratare cu hidroxid de sodiu *Mycobacterium tuberculosis* în stare pură, dintr-un produs cu floră asociată;
- folosind toleranța unor microorganisme față de unele substanțe chimice (izolarea stafilococului pe medii hiperclorurate sau a clostridiilor patogene pe medii cu fenol);
- folosind acțiunea selectivă a antibioticelor, se pot izola dintr-un produs cu floră asociată microorganisme rezistente la antibioticul respectiv (izolarea agentului tusei convulsive pe mediul Bordet-Gengou cu penicilină).

4.2.4. Izolarea prin metode biologice

Această metodă se bazează pe receptivitatea particulară a unor animale de laborator față de unele specii microbiene. Astfel, pentru izolarea pneumococului din spută se procedează la inocularea unui șoarece de 16-20 g, pe cale subcutanată, cu o cantitate de 0,5 ml din produsul fluidificat cu ser fiziologic. În primele 24 ore, șoarecele moare de septicemie și prin

hemocultură se izolează pneumococul în stare pură. Pe același principiu se bazează izolarea speciei *Mycobacterium tuberculosis* din produse patogene, prin inoculare pe cale subcutanată la cobai.

Pentru ca microorganismele să se poată dezvolta, mediile nutritive însămânțate sunt incubate la temperaturi corespunzătoare dezvoltării microoganismului studiat. Incubarea se face în aparate speciale numite termostate (Fig. 24) prevăzute cu termometre de contact care permit reglarea temperaturii dorite.

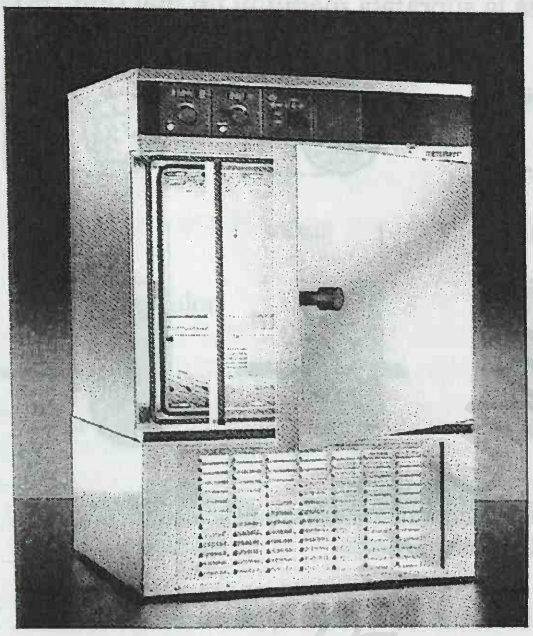


Fig. 24 – Termostat

4.3. CULTURI ŞI COLONII MICROBIENE

Cultivarea microorganismelor se poate face în medii lichide și pe medii solide.

Cultivate în medii lichide, microorganismele formează **culturi** al căror aspect este diferit în funcție de grup, de specie și de proprietățile fizico-chimice ale mediului.

Culturile prezintă o serie de caracteristici care pot fi utile pentru identificarea speciilor cultivate și pentru eventualele forme de variabilitate:

- *gradul de tulburare al mediului*: formarea de sediment; formarea de peliculă la suprafața mediului; formarea de văl sau inel etc.;
- *mirosul* pe care îl degajă cultura;
- *pigmentarea culturii*; tipul pigmentului.

Astfel, *Staphylococcus aureus* tulbură uniform mediul; *Escherichia coli* tulbură bulionul cu formarea de unde mătăsoase, iar *Streptococcus* sp. și *Bacillus anthracis* tulbură mediul, după care formează un depozit floconos. *Streptococcus faecalis* formează un depozit vâscos.

Unele specii care nu tulbură mediul, formează o peliculă sau un văl la suprafață, care poate fi subțire și fragil (*Corynebacterium diphtheriae*), compact și plisat (*Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus*), gros și gofrat (*Mycobacterium tuberculosis*) sau vâscos (*Pseudomonas aeruginosa*). *Klebsiella pneumoniae* formează la suprafața mediului un inel (Fig. 25).

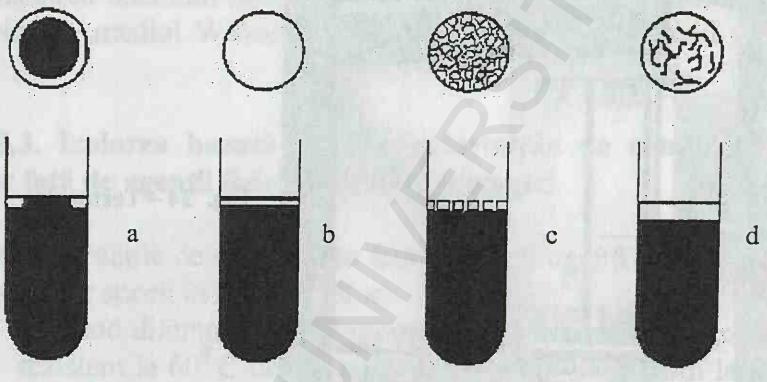


Fig. 25 – Dezvoltare la suprafața bulionului: a-inelară; b-peliculară; c-floculată; d-membranoasă.

Actinomicetele cresc sub formă de colonii și în mediile lichide. Pe astfel de medii, cultivate în profunzime, cele mai multe specii nu mai formează spori. În aceste condiții, miceliul se fragmentează în celule mici, bacilare sau cocoide.

Mucegaiurile formează la suprafața mediilor lichide o pânză miceliană, ceea ce face ca diferitele părți ale miceliului să se găsească în condiții diferite de aerobioză.

Cultivate pe medii solide, microorganismele se dezvoltă sub formă de **colonii**. Colonia reprezintă o populație celulară rezultată din creșterea și multiplicarea uneia sau a mai multor celule aparținând aceleiași specii sau tulpini.

Caracterizarea coloniilor implică precizarea următoarelor aspecte (Fig. 26):

- dimensiunile: 1 mm la streptococ; câțiva mm la bacili; 1 cm și chiar mai mult la levuri;

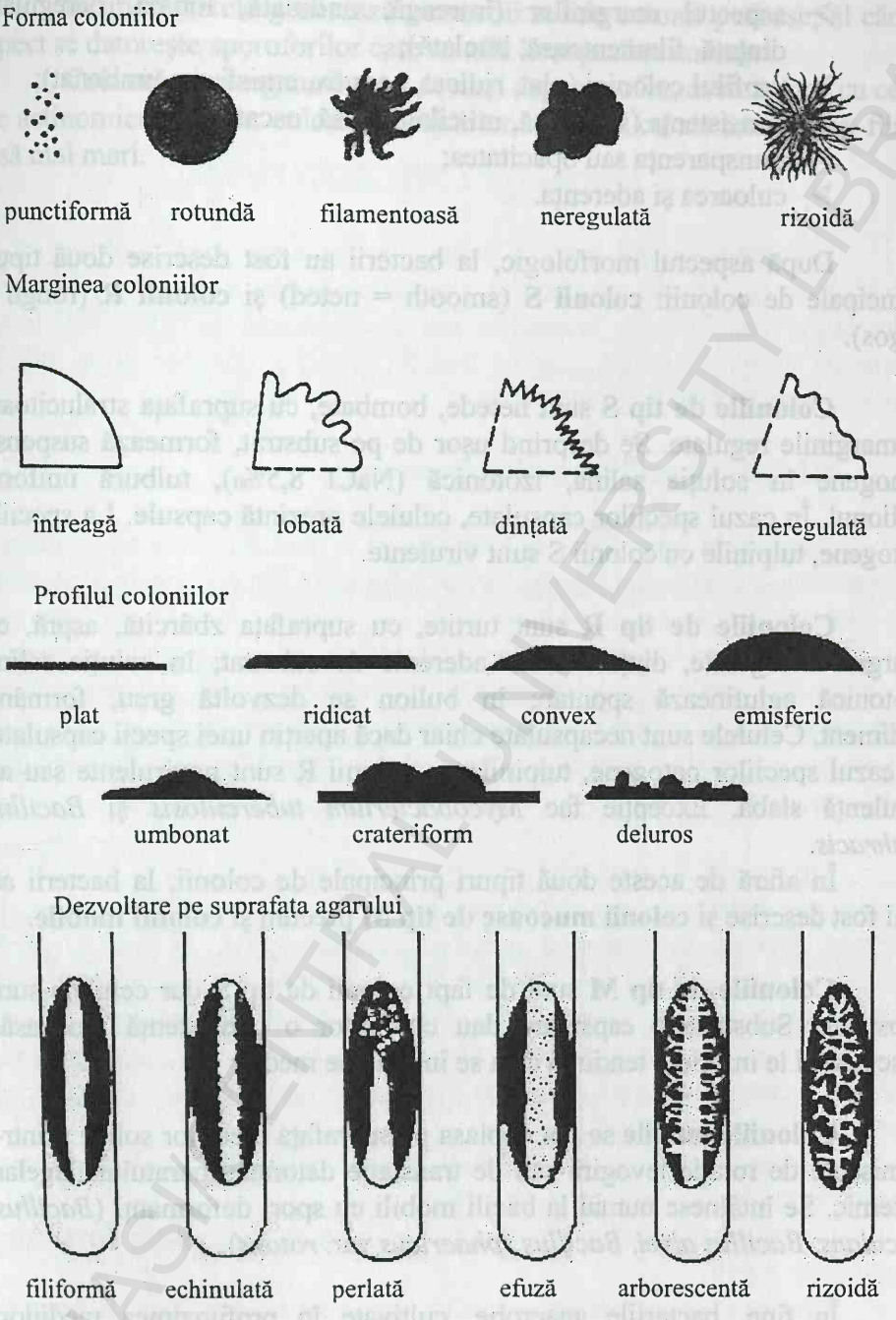


Fig. 26 – Morfologia coloniilor bacteriene

- forma (punctiformă, rotundă, filamentoasă, neregulată, rizoidă, fusiformă etc.);

BCU IASI - UNIVERSITY LIBRARY

- aspectul marginilor (întreagă, ondulată, lobată, neregulată, dințată, filamentoasă, buclată);
- profilul coloniei (plat, ridicat, convex, emisferic, umbonat);
- consistența (vâscoasă, mucilaginoasă, uscată);
- transparența sau opacitatea;
- culoarea și aderența.

După aspectul morfologic, la bacterii au fost descrise două tipuri principale de colonii: **colonii S** (smooth = neted) și **colonii R** (rough = rugos).

Coloniile de tip S sunt netede, bombate, cu suprafața strălucitoare și marginile regulate. Se desprind ușor de pe substrat, formează suspensii omogene în soluție salină, izotonică (NaCl 8,5‰), tulbură uniform bulionul. În cazul speciilor capsulate, celulele prezintă capsule. La speciile patogene, tulpinile cu colonii S sunt virulente.

Coloniile de tip R sunt turtite, cu suprafața zbârcită, aspră, cu margini neregulate, dințate. Sunt aderente de substrat; în soluție salină izotonică aglutinează spontan; în bulion se dezvoltă greu, formând sediment. Celulele sunt necapsulate chiar dacă aparțin unei specii capsulate. În cazul speciilor patogene, tulpinile cu colonii R sunt nevirulente sau au virulență slabă. Excepție fac *Mycobacterium tuberculosis* și *Bacillus anthracis*.

În afară de aceste două tipuri principale de colonii, la bacterii au mai fost descrise și **colonii mucoase de tip M** precum și **colonii mobile**.

Coloniile de tip M sunt de fapt colonii de tip S dar celulele sunt capsulate. Substanțele capsulare dau coloniilor o consistență mucoasă-vâscoasă și le imprimă tendința de a se întinde pe mediu.

Coloniile mobile se pot deplasa pe suprafața mediilor solide printr-o mișcare de rotație levogiră sau de translație datorată aparatului flagelar puternic. Se întâlnesc numai la bacili mobili cu spori deformanți (*Bacillus circulans, Bacillus alvei, Bacillus sphaericus* var. *rotans*).

În fine, bacteriile anaerobe, cultivate în profunzimea mediilor solide, pot forma trei tipuri de colonii profunde: lenticulare-biconvexe (*Clostridium perfringens*), pufoase (*Clostridium sporogenes*) și arborescente (*Clostridium septicum*).

Actinomicetele generează pe medii solide colonii pufoase, al căror aspect se datorește sporoforilor care se află la suprafața coloniei.

Coloniile mucegaiurilor au același aspect pufos, asemănător cu cele ale actinomicetelor, iar coloniile drojdiilor seamănă cu ale bacteriilor, fiind însă mai mari.

BOUAS CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

5. TEHNICA EXAMINĂRII CARACTERELOR MORFOLOGICE ŞI TINCTORIALE ALE BACTERIILOR

5.1. EXAMENUL MICROSCOPIC

Celula bacteriană, datorită dimensiunilor ei, nu poate fi observată cu ochiul liber, ci numai cu ajutorul aparatelor optice speciale. În vederea examenului microscopic, bacteriile pot fi examinate în stare vie, într-o suspensie în ser fiziologic, sau pe frotiuri fixate şi colorate după diferite tehnici, practică folosită în mod curent.

5.1.1. Examenul bacteriilor în stare vie

Examenul între lamă şi lamelă - pe o lamă de sticlă bine curăţată şi degresată se depune cu pipeta Pasteur o picătură din suspensia bacteriană de cercetat: picătura se acoperă cu o lamelă curată; se coboară condensatorul şi se închide parţial diafragma de câmp; se aşază preparatul pe platina orizontală şi se examinează cu un obiectiv uscat, puternic (40 x), după trecerea a 4 minute, necesare pentru stabilizarea preparatului; după examinare, preparatul se depune într-un borcan cu soluţie dezinfectantă (ex. amestec sulfocromic).

Examenul în picătură suspendată (Fig. 27) – pe o lamelă, se depune o picătură de ser fiziologic în care se suspendă bacteriile de observat. Lamela se răstoarnă printr-o mişcare rapidă, în aşa fel încât picătura de suspensie să nu se prelingă şi se depune pe o lamă excavată; picătura suspendată trebuie să fie deasupra godeului, iar manipularea preparatului trebuie făcută în aşa încât picătura să nu se prelingă şi să nu ajungă în contact cu pereţii godeului. Se examinează imediat la microscop cu un obiectiv uscat, puternic (40 x).

Ambele metode de examinare la microscop se folosesc pentru punerea în evidenţă a mobilităţii bacteriilor.

În realizarea examenului bacteriilor în stare vie trebuie respectate următoarele reguli:

- ✓ când se execută suspensia microbiană trebuie avut grijă ca lama şi pipeta sau firul metalic al ansei de însămânţare să fie bine răcite, pentru a nu distruge microorganismele prin căldură;
- ✓ examenul microscopic trebuie făcut cât mai rapid după depunerea culturii pe lamă, pentru a nu se usca.

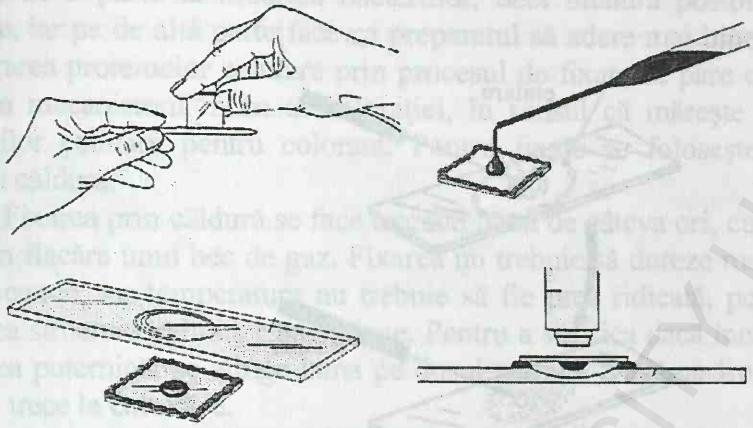


Fig. 27 - Examenul în picătură suspendată

5.1.2. Examenul bacteriilor în frotiuri colorate

Tehnica executării frotiurilor

În vederea examinării, bacteriile sunt depuse pe o lamă sterilă de sticlă. Operaţiunea de întindere a materialului bacterian pe lamă este denumită, în mod curent, **"executarea unui frotiu"**, termenul de frotiu fiind utilizat pentru desemnarea lamei cu materialul microbian etalat pe suprafaţa ei.

Pentru prepararea frotiurilor se folosesc lame de sticlă curate şi bine degresate. Degresarea se face prin păstrarea lamelor în cristalizoare cu alcool. În momentul utilizării, lamele se şterg cu tifon apoi se flambează la flacăra becului de gaz.

Frotiurile se execută fie cu ajutorul ansei, fie cu pipeta Pasteur.

Materialele biologice din care se execută aceste frotiuri, sunt reprezentate de culturile bacteriene sau de diferite produse patologice.

Timpii de efectuare ai frotiului (Fig. 28) sunt următorii:

- ☑ etalarea;
- ☑ uscarea la temperatura camerei;
- ☑ fixarea prin căldură;
- ☑ colorarea.

Etalarea constă în întinderea produsului de examinat pe lamă cu ajutorul unei anse sau cu pipeta Pasteur, în aşa fel încât să se obţină un strat subţire şi uniform, pe o suprafaţă aproximativ de 2 cm^2, care să cuprindă centrul lamei şi să nu atingă marginile ei.

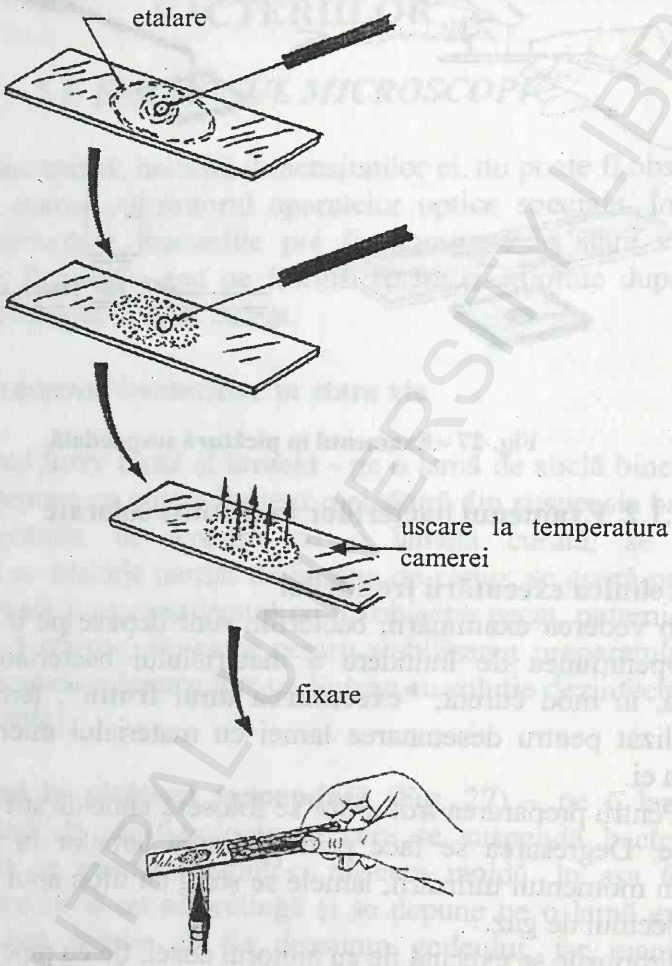


Fig. 28 – Tehnica executării frotiului

Dacă produsul de examinat este o cultură microbiană într-un mediu lichid, se depune cu pipeta Pasteur o picătură din cultură în centrul lamei şi apoi se etalează. Dacă produsul de cercetat este o cultură pe mediul solid, se omogenizează o porţiune dintr-o colonie într-o picătură de ser fiziologic sau apă distilată pusă pe lamă, după care se întinde.

Uscarea – frotiul astfel executat se lasă să se usuce la temperatura camerei sau la termostat.

Fixarea – este o condiţie absolut necesară în tehnica executării frotiului. Prin fixare se produce denaturarea proteinelor microbiene care

duce pe de o parte la moartea bacteriilor, deci înlătură posibilitatea de infectare, iar pe de altă parte face ca preparatul să adere mai bine pe lamă. Denaturarea proteinelor celulare prin procesul de fixare se pare că ar avea rol şi în mecanismul intim al colorației, în sensul că măreşte afinitatea structurilor celulare pentru colorant. Pentru fixare se foloseşte cel mai frecvent căldura.

Fixarea prin căldură se face trecând lama de câteva ori, cu frotiul în sus, prin flacăra unui bec de gaz. Fixarea nu trebuie să dureze mai mult de 5-10 secunde, iar temperatura nu trebuie să fie prea ridicată, pentru a nu modifica structura celulelor bacteriene. Pentru a verifica dacă încălzirea nu este prea puternică, se atinge lama pe dosul palmei. După ce frotiul a fost fixat se trece la **colorare**.

5.2. METODE DE COLORARE

Frotiurile fixate se pot colora prin trei tipuri de metode:
- ✓ metode simple;
- ✓ metode compuse sau diferențiale;
- ✓ metode speciale.

5.2.1. Coloraţia simplă

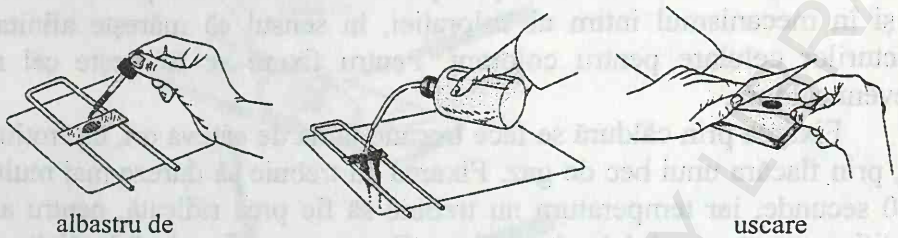
Coloraţia simplă utilizează un singur colorant (de obicei bazic) şi permite stabilirea morfologiei bacteriene precum şi punerea în evidenţă a elementelor celulare din produsele patologice.

Pentru coloraţia simplă se întrebuinţează cel mai frecvent soluţia de albastru de metilen sau fucsină fenicată Ziehl diluată 1/10. Mai rar sunt utilizate soluţiile violet de metil, violet de genţiană, albastru de toluidină etc.

Tehnica de lucru (Fig. 29):
Frotiul uscat şi fixat se acoperă cu soluţia colorantă:
- se ţine 1-2 minute;
- se varsă colorantul, se spală cu apă de robinet, se usucă;
- se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

În general, în coloraţia simplă, bacteriile iau culoarea colorantului utilizat. Unii coloranţi, în prezenţa anumitor structuri celulare, îşi modifică culoarea realizând **metacromazia**, fenomen prin care, după culoare, celulele bacteriene sau numai părţi ale acestora apar colorate altfel decât

colorantul folosit. Acest fenomen a fost explicat prin punerea în libertate a bazei colorate, care prezintă un alt spectru de absorbție decât sarea colorată.



albastru de metilen (1-2 min) | spălare cu apă de robinet | uscare

Fig. 29 – Tehnica executării colorației simple

5.2.2. Colorații compuse

Dintre colorațiile compuse, colorația Gram şi colorația Ziehl-Neelsen au cea mai largă utilizare în bacteriologie.

a. Colorația Gram

Materiale necesare:
- violet de metil - soluție apoasă (0,2%) sau violet de gențiană;
- soluție Lugol;
- alcool – acetonă 9 : 1;
- fucsină Ziehl diluată 1/10 sau soluție de safranină.

Tehnica de lucru (Fig. 30)
Colorația Gram cuprinde patru timpi:

- **Colorarea** – constă în acoperirea frotiului uscat şi fixat cu soluția de violet de metil; se menține 1-2 minute, apoi se varsă colorantul şi se spală frotiul cu apă de robinet.
- **Mordansarea** - se acoperă frotiul cu soluție Lugol şi se menține 4-5 minute, fără a se spăla cu apă.
- **Decolorarea** - este timpul cel mai important al colorației. Se acoperă frotiul cu alcool – acetonă, înclinându-se lama pentru a uşura acțiunea decolorantului. Se decolorează până când colorantul de pe lamă nu mai trece în soluție, frotiul devenind alburiu. Se spală repede cu apă de robinet pentru a opri acțiunea decolorantului.

➢ **Recolorarea** - se acoperă frotiul cu fucsină diluată 1/10 sau cu soluție de safranină, se menține colorantul 1-2 minute, după care frotiul se spală cu apă, se usucă şi se examinează la microscopul cu imersie.

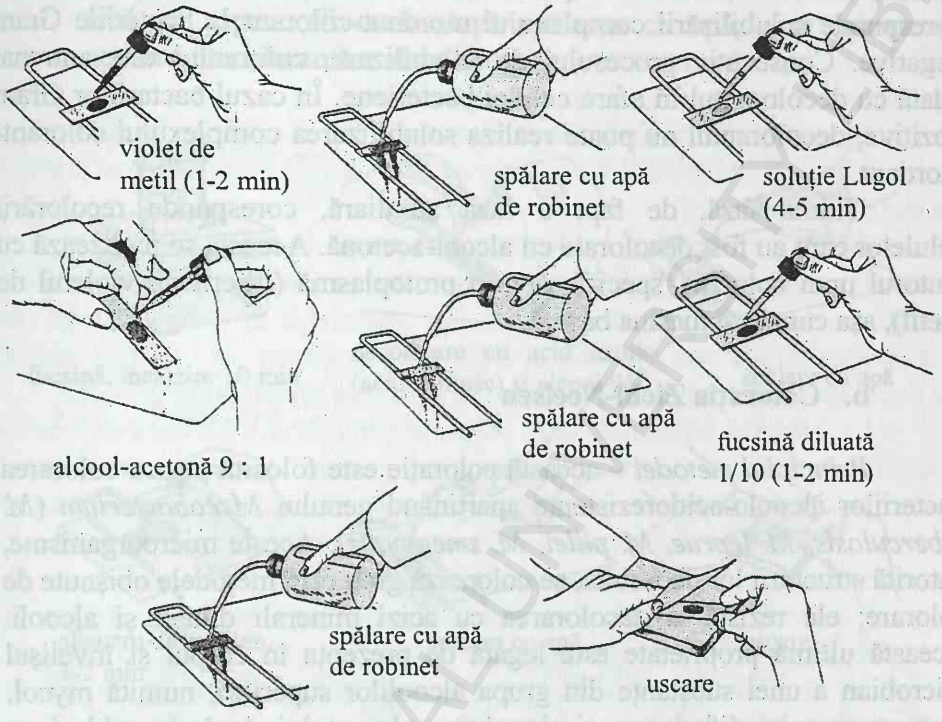


Fig. 30 – Tehnica executării colorației Gram

Metoda de colorație Gram, introdusă în bacteriologie de Christian Gram în 1884, completată ulterior, a permis gruparea bacteriilor în: Gram pozitive, Gram negative şi Gram variabile.

Bacteriile care rezistă la decolorarea cu alcool-acetonă sunt numite **Gram-pozitive** şi apar colorate în **violet.**

Bacteriile care se decolorează sub acțiunea alcool-acetonei şi se recolorează cu fucsină fenicată diluată 1/10, sunt numite **Gram-negative** şi apar colorate în **roşu.**

Bacteriile **Gram-variabile** pot fi atât Gram-pozitive cât şi Gram-negative.

Mecanismul colorației Gram

Prima fază corespunde absorbției şi difuziunii colorantului bazic (violetul de metil, violetul de gențiană) în interiorul protoplasmei.

Mordantul (soluția Lugol) reacționează cu colorantul dând naştere unui complex insolubil mordant-colorant.

La bacteriile Gram pozitive complexul mordant-colorant este puternic fixat de structura polizaharido-ribonucleoproteică a peretelui celular şi a membranei citoplasmatice. Decolorarea cu alcool-acetonă corespunde solubilizării complexului mordant-colorant la bacteriile Gram negative. Consecutiv procesului de solubilizare, colorantul este antrenat odată cu decolorantul în afara celulei bacteriene. În cazul bacteriilor Gram pozitive, decolorantul nu poate realiza solubilizarea complexului colorant-mordant.

Ultima fază, de fapt o fază auxiliară, corespunde recolorării celulelor care au fost decolorate cu alcool-acetonă. Aceasta se realizează cu ajutorul unui colorant, specific pentru protoplasmă (diferit de violetul de metil), aşa cum este fucsina bazică.

b. Coloraţia Ziehl-Neelsen

Principiul metodei – această coloraţie este folosită pentru colorarea bacteriilor alcoolo-acidorezistente aparţinând genului *Mycobacterium* (*M. tuberculosis, M. leprae, M. phlei, M. smegmatis)*. Aceste microorganisme, datorită structurii lor deosebite, se colorează greu prin metodele obişnute de colorare; ele rezistă la decolorarea cu acizi minerali diluaţi şi alcooli. Această ultimă proprietate este legată de prezenţa în corpul şi învelişul microbian a unei substanţe din grupa alcoolilor superiori, numită mycol, care nu permite difuziunea şi absorbţia colorantului decât la cald şi cu soluţii concentrate fenicate.

Materiale necesare:
- fucsină fenicată Ziehl;
- acid azotic diluat 1/3 sau acid sulfuric diluat 1/5;
- alcool 96^0;
- albastru de metilen;
- cultură de *Mycobacterium tuberculosis*.

Tehnica de lucru (Fig. 31)

- **Colorarea** - frotiul uscat şi fixat se aşază pe un suport metalic şi se acoperă cu fucsină fenicată Ziehl, încălzindu-se uşor dedesubt până la emitere de vapori (fără a ajunge la fierbere), timp de 10 minute. În acest timp preparatul trebuie să fie în permanenţă acoperit cu soluţie colorantă. Dacă prin evaporare cantitatea de colorant scade,

aceasta se înlocuieşte imediat pentru a nu se degrada preparatul. Se varsă apoi colorantul, iar lama se spală cu apă de robinet.

- **Decolorarea** - se face cu soluţie de acid azotic 1/3 sau acid sulfuric 1/5 care se ţine timp de 2 minute; decolorarea se continuă cu alcool 96^0 până la îndepărtarea completă a colorantului; frotiul trebuie să aibă un aspect alb-roziu după spălarea cu apă, care opreşte şi acţiunea decolorantă a alcoolului.

Fig. 31 – Tehnica colorației Ziehl-Neelsen

- **Recolorarea** - se face cu o soluţie hidro-alcoolică fenicată de albastru de metilen în timp de 1-2 minute, după care preparatul se spală cu apă, se usucă şi se examinează la imersie.

Bacteriile alcoolo-acidorezistente se colorează în roşu iar cele nealcoolo-rezistente (precum şi fondul preparatului) se colorează în albastru.

5.2.3. Colorații speciale

Colorațiile speciale sunt folosite pentru a pune în evidență unele elemente structurale ale bacteriilor care nu pot fi observate prin colorațiile obişnuite. Coloranții structurali pot fi utilizați la identificarea şi studierea structurii bacteriei. În mod curent, cele mai fine detalii structurale sunt examinate utilizând microscopul electronic, dar şi tehnicile clasice de

colorare (utilizate şi în prezent) pot da informaţii asupra unor structuri ca: sporul bacterian, capsula, peretele celular, incluziunile citoplasmatice.

Colorarea sporilor bacterieni

Sporii bacterieni sunt structuri ce prezintă rezistenţă la temperaturi ridicate, radiaţii, desicaţie şi agenţii chimici cum sunt dezinfectanţii, motiv pentru care se mai numesc şi „corpi de rezistenţă".

La unele bacterii, forma vegetativă, adică forma de creştere şi multiplicare, se poate transforma într-un spor, acestea numindu-se bacterii sporogene.

Endosporii au fost evidenţiaţi la bacterii aparţinând la 10 genuri. Dintre acestea menţionăm genurile: *Bacillus, Clostridium, Desulfotomaculum, Sporosarcina* şi *Sporolactobacillus*. Din punct de vedere morfologic speciile care aparţin acestor genuri sunt în majoritatea lor bacili (exceptând genul *Sporosarcina* care este reprezentat de coci).

La bacteria fotosintetizantă purpurie nesulfuroasă *Rhodomicrobium vanniellii* precum şi la speciile aparţinând genului *Methylosinus* au fost evidenţiaţi exospori, structuri care sunt rezistente la căldură şi uscăciune dar care se disting de endosporii bacterieni prin compoziţia chimică, caracteristicile structurale şi modul de formare.

Bacteriile formează spori ca un mecanism de supravieţuire la condiţiile nefavorabile ale mediului de viaţă. Sporogeneza la bacterii nu este o formă de multiplicare ca la plante şi fungi, deoarece fiecare celulă bacteriană produce numai un singur spor, care germinează formând în final o singură celulă vegetativă (Fig. 32).

Sporii bacterieni pot rămâne dormanzi chiar mii de ani (au fost izolaţi spori viabili din probe arheologice, cu o vechime de 3000 ani).

Forma şi localizarea sporilor în interiorul celulei vegetative prezintă o mare importanţă în identificarea şi clasificarea microorganismelor. Astfel, sporul poate avea formă rotundă sau ovală, poate ocupa o poziţie centrală, subterminală sau terminală (Fig. 33).

Diametrul sporului poate fi mai mic sau mai mare decât diametrul transversal al celulei bacteriene. După acest criteriu sporii sunt încadraţi în două categorii:

- ✓ **spori nedeformanţi** - al căror diametru transversal nu depăşeşte pe cel al celulei. Se întâlnesc la genul *Bacillus,* unde pot avea poziţie centrală (*Bacillus anthracis*), subterminală (*Bacillus cereus*) şi terminală (*Bacillus subtilis*); la *Bacillus subtilis* se întâlnesc toate cele trei poziţii ale sporului;

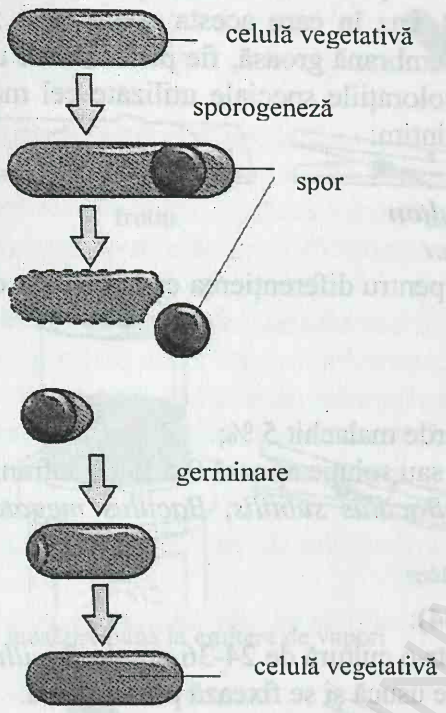


Fig. 32 – Sporogeneza şi germinarea la bacterii

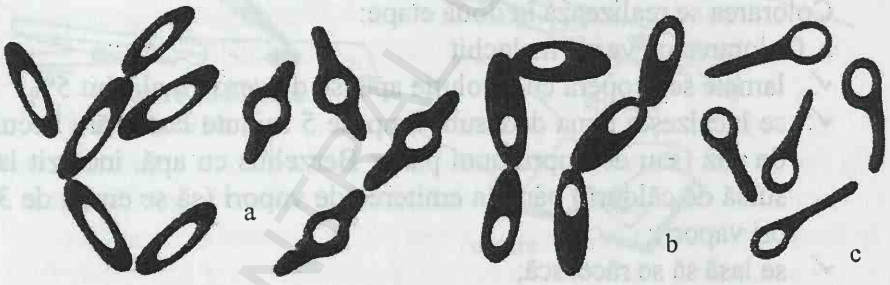


Fig. 33 – Dispoziția sporilor în celula bacteriană:
a) centrală; b) subterminală; c) terminală.

- ✓ **spori deformanți** - al căror diametru fiind mai mare decât al celulei, deformează celula bacteriană dându-i diferite aspecte. Se întâlnesc la genul *Clostridium*, unde pot avea poziție centrală (*Clostridium pasteurianum*), subterminală (*Clostridium sporogenes*) şi terminală (*Clostridium tetani*).

Există specii de bacili sporulați care pot provoca boli grave: *Bacillus anthracis* (antraxul), *Clostridium botulinum* (botulismul), *Clostridium perfringens* (gangrene), *Clostridium tetani* (tetanosul).

Sporul bacterian poate fi pus în evidență fie printr-o colorație obișnuită (ex. coloraţia Gram), caz în care acesta apare ca o formațiune refringentă, înconjurată de o membrană groasă, fie prin metode de colorare speciale pentru spori. Dintre colorațiile speciale utilizate cel mai frecvent pentru evidențierea sporilor amintim:

➢ ***Metoda Schaeffer-Fulton***

Este o metodă utilizată pentru diferențierea endosporilor de celulele vegetative.

Materiale necesare:
- soluție apoasă de verde malachit 5 %;
- fucsină diluată 1/10 sau soluție apoasă 0,5 % de safranină;
- culturi bacteriene (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*) de 24-36 ore.

Tehnica de lucru (Fig. 34):
Se execută un frotiu dintr-o cultură de 24-36 ore de *Bacillus subtilis* sau *Bacillus megaterium,* care se usucă şi se fixează prin căldură.

Colorarea se realizează în două etape:
a. Colorarea cu verde malachit
- ✓ lamele se acoperă cu o soluție apoasă de verde malachit 5%;
- ✓ se încălzește lama dedesubt timp de 5 minute la flacăra becului de gaz (sau deasupra unui pahar Berzelius cu apă, încălzit la o sursă de căldură) până la emiterea de vapori (să se emită de 3-4 ori vapori);
- ✓ se lasă să se răcească;
- ✓ se spală cu apă de robinet.

b. Colorarea cu fucsină sau safranină
- ✓ se colorează timp de 1 minut cu fucsină diluată 1/10 sau cu soluție apoasă 0,5 % safranină;
- ✓ se spală, se usucă, se examinează la microscop la obiectivul cu imersie.

La examenul microscopic se observă că celulele vegetative apar colorate în roşu iar sporii în verde.

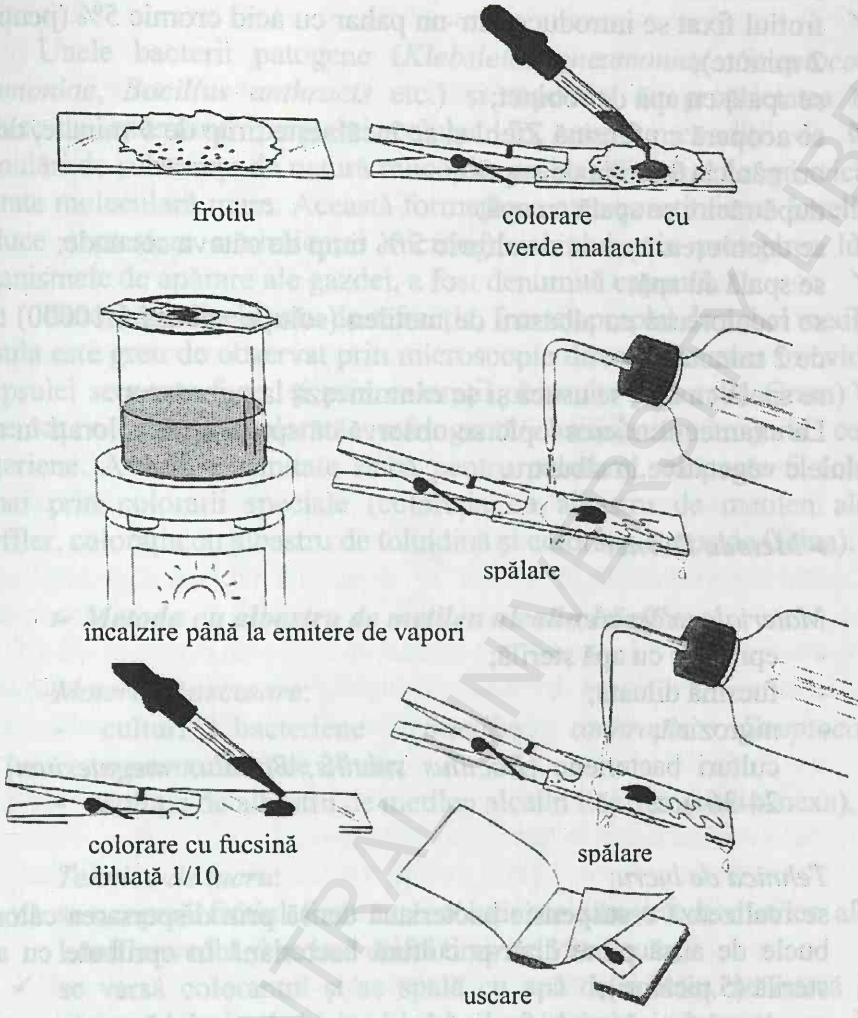


Fig. 34 – Tehnica coloraţiei Schaeffer-Fulton

➢ ***Metoda Möller***

Materiale necesare:
- acid cromic 5%;
- fucsină Ziehl;
- acid sulfuric 5 %;
- soluţie apoasă albastru de metilen (vezi Anexa);
- culturi bacteriene (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*) de 24-36 ore.

Tehnica de lucru:

- ✓ frotiul fixat se introduce într-un pahar cu acid cromic 5% (pentru 1-2 minute);
- ✓ se spală cu apă de robinet;
- ✓ se acoperă cu fucsină Ziehl şi se încălzeşte timp de 5 minute, de 2-3 ori până la apariţia de vapori;
- ✓ după răcire se spală cu apă;
- ✓ se decolorează cu acid sulfuric 5 % timp de câteva secunde;
- ✓ se spală cu apă;
- ✓ se recolorează cu albastru de metilen (soluţie apoasă 1:10000) timp de 2 minute;
- ✓ se spală cu apă, se usucă şi se examinează la microscop.

La examenul microscopic se observă că sporii apar colorați în roşu iar celulele vegetative în albastru.

➢ ***Metoda Dorner***

Materiale necesare:

- eprubete cu apă sterilă;
- fucsină diluată;
- nigrozină;
- culturi bacteriene (*Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*) de 24-36 ore.

Tehnica de lucru:

- ✓ se realizează o suspensie bacteriană densă prin dispersarea câtorva bucle de ansă pline dintr-o cultură bacteriană în eprubete cu apă sterilă (5 picături);
- ✓ se adaugă 5 picături de fucsină în suspensia bacteriană;
- ✓ se încălzeşte suspensia astfel obţinută într-un vas cu apă, timp de 10 minute;
- ✓ pe o lamă de sticlă se amestecă o picătură de nigrozină cu câteva bucle de ansă din suspensia respectivă;
- ✓ se etalează picătura pe toată suprafaţa lamei;
- ✓ se usucă în aer după care se examinează la imersie.

În urma acestei colorații sporii apar colorați în roşu iar celulele vegetative necolorate.

Colorarea capsulei

Unele bacterii patogene (*Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis* etc.) şi saprofite au proprietatea de a produce la exteriorul peretelui celular, în anumite condiţii de viaţă, acumulări de substanţe de natură mucoidă, polizaharidică, glicoproteică, cu greutate moleculară mare. Această formaţiune care constituie un înveliş, ce produce o creştere a virulenţei microoganismului prin protejarea lui de mecanismele de apărare ale gazdei, a fost denumită **capsulă**.

Datorită indicelui său de refracţie, foarte apropiat de cel al mediului, capsula este greu de observat prin microscopie directă. Punerea în evidenţă a capsulei se poate face şi prin colorații obişnuite (colorația Gram) când apare ca o zonă necolorată, refringentă, luminoasă, în jurul celulei bacteriene. Având o afinitate slabă pentru coloranți, ea poate fi colorată numai prin colorații speciale (colorația cu albastru de metilen alcalin Löeffler, colorația cu albastru de toluidină şi colorația cu tuş de China).

➢ ***Metoda cu albastru de metilen alcalin Löeffler***

Materiale necesare:
- culturi bacteriene (*Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*) de 24 ore;
- soluţie de albastru de metilen alcalin Löeffler (vezi Anexa).

Tehnica de lucru:
- ✓ se acoperă frotiul fixat cu o soluţie de albastru de metilen alcalin Löeffler vechi şi se lasă astfel timp de 15 minute;
- ✓ se varsă colorantul şi se spală cu apă de robinet, se usucă şi se observă la microscop la obiectivul cu imersie.

Dată fiind structura deosebită a capsulei faţă de cea a corpului bacterian, aceasta se va colora deosebit, metacromatic. Capsula va apare colorată în roz, în timp ce corpul bacterian se va colora în albastru.

➢ ***Metoda cu albastru de toluidină***

Materiale necesare:
- culturi bacteriene (*Bacillus anthracis*, *Streptococcus pneumoniae*) de 24 ore;
- soluţie de albastru de toluidină.

Tehnica de lucru:

- ✓ frotiul fixat se acoperă cu o soluție de albastru de toluidină care se lasă pe lamă timp de 1-2 minute;
- ✓ se varsă colorantul, se spală, se usucă şi se examinează la imersie.

Capsula apare colorată în roz, iar corpul bacterian în albastru.

➢ ***Coloraţia negativă cu tuş de China (metoda Burri)***

Materiale necesare:

- tuş de China;
- soluție de albastru de metilen alcalin Löeffler (sau safranină).

Tehnica de lucru (Fig. 35):

- ✓ pe o lamă de sticlă se pune o picătură de ser fiziologic în care se face o suspensie din bacteria de analizat; alături se pune o picătură de tuş care se va amesteca cu suspensia obținută;
- ✓ tehnica executării frotiurilor se aseamănă cu cea a frotiurilor de sânge: marginea unei lame şlefuite se aplică pe lama cu suspensia în aşa fel încât cele două lame să facă între ele un unghi de 30-45^0; cu o mişcare uniformă de translație (uşoară şi rapidă) se împinge lama şlefuită spre stânga până ce întreaga picătură de suspensie este epuizată; întinderea frotiului nu trebuie întreruptă, iar lama nu trebuie ridicată decât atunci când picătura de suspensie s-a epuizat, după care se usucă la temperatura camerei;
- ✓ frotiurile se colorează timp de 1-2 minute cu soluție de albastru de metilen alcalin Löeffler (sau safranină);
- ✓ se varsă colorantul iar lama se spală cu apă de robinet;
- ✓ după uscare se examinează la microscop.

La examenul microscopic se observă un fond negru pe care bacteriile apar colorate în albastru (sau roşu). În jurul celulelor bacteriene se observă o zonă clară, necolorată care corespunde capsulei (Fig. 36).

Colorarea cililor bacterieni

Cilii (flagelii) sunt formațiuni filamentoase lungi şi subțiri, flexibile şi fragile care constituie organite de locomoție.

Cilii sunt prezenți la majoritatea spirililor şi vibrionilor şi la aproximativ jumătate din bacteriile cu formă de bastonaş. Excepțional cilii se pot întâlni la coci.

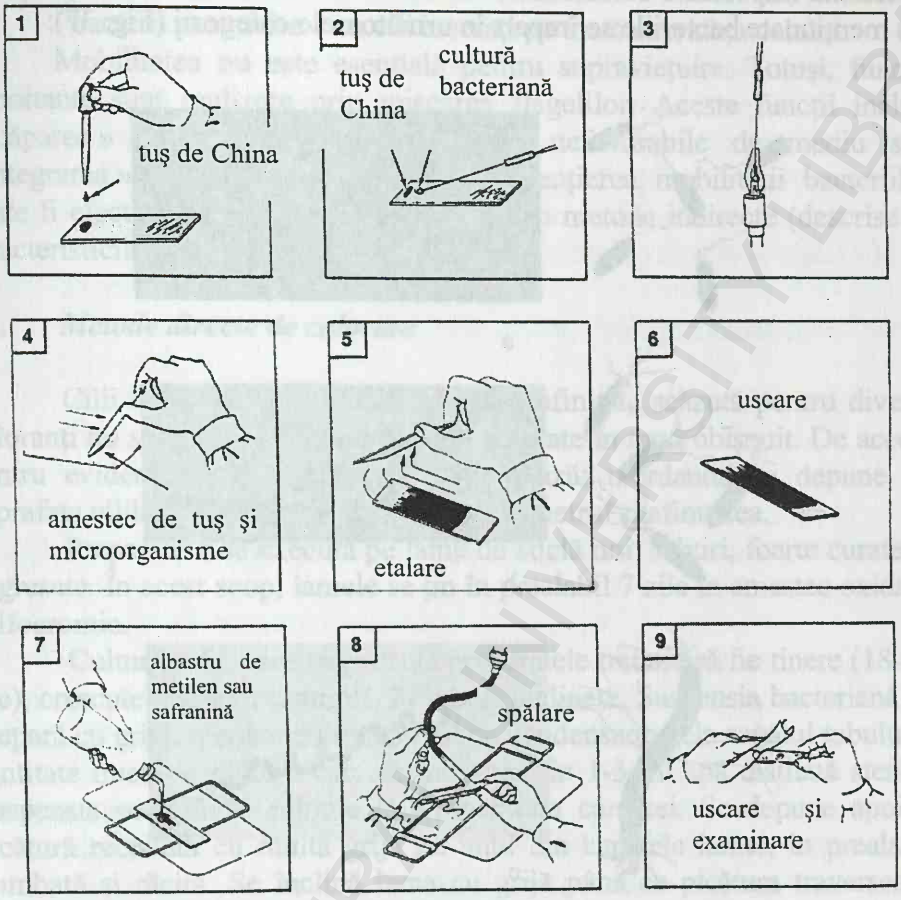


Fig. 35 - Coloraţia negativă a capsulei cu tuş de China (metoda Burri)

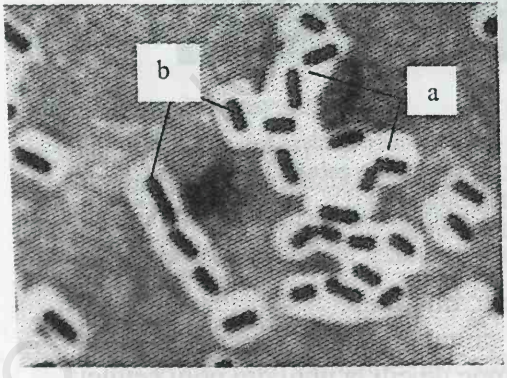


Fig. 36 – Aspectul capsulei
(după Wistreich, 1997)
a-capsulă;
b-celule vegetative.

Prezența cililor, modul de atașare și numărul lor la microorganisme, reprezintă importante caracteristici taxonomice. În funcție de criteriile mai sus menționate bacteriile se împart în următoarele categorii (Fig. 37):

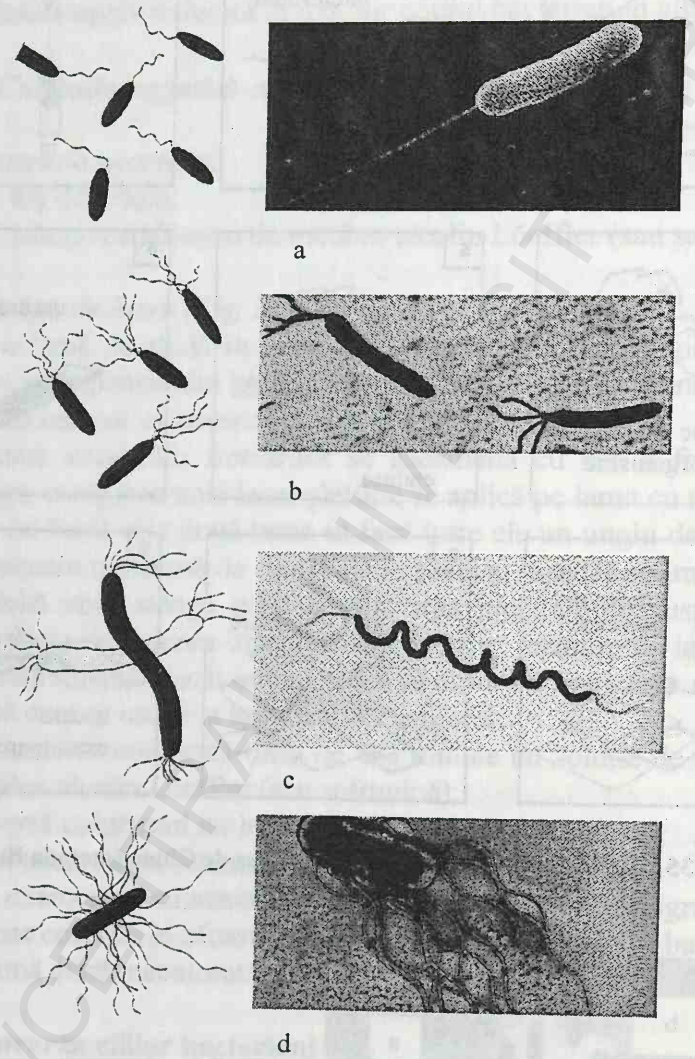


Fig. 37 – Dispoziția flagelilor pe suprafața celulei bacteriene
(după Alexander, Strete, 2001):
a-monotrichă; b-lofotrichă; c-amfitrichă; d-peritrichă.

- bacterii atriche – lipsite de cili, imobile;
- bacterii monotriche – cu un singur cil la unul din polii celulei;
- bacterii lofotriche – cu un smoc de cili la unul din polii celulei;

- bacterii amfitriche – cu un singur cil sau smoc de cili la ambii poli ai celulei;

- bacterii peritriche – cu cili inserați pe toată suprafața celulei.

Mobilitatea nu este esențială pentru supraviețuire. Totuşi, funcții importante sunt realizate prin mişcarea flagelilor. Aceste funcții includ « scăparea » de prădători, de condițiile nefavorabile de mediu sau « integrarea » în relațiile simbiotice. Evidențierea mobilității bacteriilor poate fi efectuată prin metode directe şi prin metode indirecte (descrise la caracteristicile morfologice ale bacteriilor).

Metode directe de colorare

Cilii fiind foarte subțiri şi având o afinitate scăzută pentru diverşi coloranți nu sunt vizibili în preparatele colorate în mod obişnuit. De aceea, pentru evidențierea lor, cilii se mordansează; mordantul se depune pe suprafața cililor şi în acest fel le măreşte diametrul şi afinitatea.

Preparatele se execută pe lame de sticlă noi, subțiri, foarte curate şi degresate. În acest scop, lamele se țin în prealabil 7 zile în amestec oxidant sulfocromic.

Culturile din care se execută preparatele trebuie să fie tinere (18-20 ore), crescute pe geloză simplă, în tuburi înclinate. Suspensia bacteriană se prepară cu grijă, recoltând din lichidul de condensare de la capătul tubului o cantitate mică de cultură care se introduce în 1-3 ml apă distilată sterilă. Suspensia se lasă 30 minute la temperatura camerei. Se depune apoi o picătură recoltată cu multă grijă pe unul din capatele lamei, în prealabil flambată şi răcită. Se înclină lama cu grijă până ce picătura traversează lungimea ei şi apoi se usucă la aer.

Acest mod de pregătire a preparatelor este valabil pentru oricare din metodele de colorare utilizate.

➢ *Metoda Bailey (modificată de Fischer şi Conn)*

Materiale necesare:
- soluția A: mordant fier-tanin;
- soluția B: substanță colorantă –mordant;
- soluția C: soluție de fucsină Ziehl.

Prepararea soluțiilor este prezentată în Anexă.

Tehnica de lucru:

✓ pe preparatul executat prin metoda descrisă mai sus, se filtrează soluția A (pe lamă) şi se lasă timp de 3-5 minute fără încălzire;

- ✓ se înlătură soluția A şi fără a se spăla cu apă se adaugă soluția B, de asemenea filtrată direct pe lamă; aceasta se ține pe lamă timp de 7 minute;
- ✓ preparatul se spală cu apă distilată;
- ✓ se acoperă apoi cu fucsină şi se ține un minut, timp în care se execută o uşoară încălzire (până la prima emitere de vapori);
- ✓ preparatul se spală apoi cu apă de robinet, se usucă la aer şi se examinează la microscop la obiectivul cu imersie.

Celulele şi cilii se colorează în roşu.

➢ ***Metoda Leifson***

Materiale necesare:
- fucsină bazică (soluție 1,2% în alcool etilic 95%);
- soluție acid tanic (3% în apă distilată);
- soluție NaCl 1,5%.

Soluția stoc se face amestecând cantități egale din cele trei soluții şi se păstrează la frigider.

Tehnica de lucru:
- ✓ se acoperă frotiul cu 1 ml din soluția colorantă şi se lasă 20-30 minute; în acest timp se formează precipitate din cauza evaporării alcoolului;
- ✓ când precipitatele îşi schimbă culoarea, colorantul se îndepărtează prin spălare. După spălare, se usucă la aer şi se examinează la microscop la obiectivul de imersie.

Cilii se colorează în roz sau roşu iar corpul bacterian poate fi necolorat sau colorat în roz pal.

Colorarea peretelui celular

Bacteriile prezintă un perete celular rigid care este uşor observabil la microscopul electronic. Datorită indicelui său de refracție mic, peretele celular este invizibil ori foarte greu vizibil la microscopul fotonic. Evidențierea lui este posibilă numai dacă se face o colorare specială. La celulele tinere, peretele celular aderă intim la conținutul celular subiacent. La celulele bătrâne sau la cele în curs de liză, peretele celular devine evident, fiind depărtat de citoplasmă.

➢ ***Metoda cu cetylpirimidină***

Materiale necesare:

- culturi de 24 ore de *Escherichia coli* şi *Bacillus cereus* pe agar nutritiv;
- clorură de cetylpirimidină N/100;
- soluţie apoasă saturată de roşu Congo;
- soluţie apoasă de albastru de metilen.

Tehnica de lucru:

- ✓ se prepară frotiuri din cele două culturi de bacterii, care se fixează prin căldură;
- ✓ se adaugă trei picături din soluţia de cetylpirimidină pe fiecare frotiu;
- ✓ se adaugă o picătură de roşu de Congo pe fiecare frotiu şi se amestecă picăturile cu ansa fără a se atinge frotiul;
- ✓ se roteşte uşor lama dând o mişcare picăturilor de deasupra fiecărui frotiu;
- ✓ se înlătură colorantul cu apă;
- ✓ se recolorează timp de 10 secunde cu albastru de metilen;
- ✓ se înlătură colorantul şi se usucă lama.

Observarea preparatului se face la obiectivul de imersie.

În cazul când nu avem clorură de cetylpirimidină se poate folosi următoarea metodă:

- ✓ frotiul se fixează cu formaldehidă 5% timp de 5 minute sau la flacără;
- ✓ colorarea frotiului cu alcian blue 0,5% sau 1% (pH = 2,5-3, ajustat cu acid acetic) timp de 1 minut;
- ✓ spălarea frotiului cu apă de robinet timp de 3 minute;
- ✓ colorarea cu safranină (soluţie apoasă 1%) timp de 10 secunde;
- ✓ spălarea cu apă, uscarea şi observarea la microscop.

Peretele celular apare colorat în albastru închis, iar citoplasma în roşu.

➢ ***Metoda Bisset şi Hale***

Materiale necesare:

- culturi bacteriene de 24 ore;
- soluţie de acid fosfomolibdenic 1 %;
- soluţie apoasă de verde de metil 1 %.

Tehnica de lucru:

- ✓ pe o lamă de microscop curată şi bine degresată se execută un frotiu bacterian;
- ✓ frotiul încă puţin umed şi nefixat se acoperă cu soluţie de acid fosfomolibdenic, care se ţine pe lamă 4 minute, după care se varsă;
- ✓ nu se spală frotiul cu apă, se adaugă soluţie de verde de metil care se ţine pe lamă 5 minute;
- ✓ se spală apoi frotiul cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop, cu obiectivul de imersie.

În urma acestei colorații peretele celular apare colorat în verde închis sau albastru, iar citoplasma rămâne incoloră sau se colorează în verde slab.

Colorarea nucleului

➢ ***Metoda Robinow***

Materiale necesare:

- culturi pe mediu solid de *Bacillus subtilis* (20 ore la 37^0 C);
- acid osmic 2 %;
- alcool etilic de 90^0;
- HCl 1 N;
- soluţie Giemsa 1/20.

Tehnica de lucru:

- ✓ se execută un frotiu dintr-o cultură de *Bacillus subtilis*;
- ✓ frotiul se fixează cu ajutorul vaporilor de acid osmic 2 % (pus într-o sticlă de ceas care se aşază într-un vas de sticlă ce poate fi acoperit ermetic cu o placă de sticlă); lama cu frotiul spre acidul osmic se aşază pe sticla de ceas; durata fixării este de 1-3 minute;
- ✓ fixarea suplimentară a frotiului se face cu alcool etilic de 90^0 şi durează 20 minute, după care lama se usucă la aer;
- ✓ frotiul este supus unui proces de hidroliză într-o baie de HCl 1 N (pentru îndepărtarea ARN-ului, care maschează colorarea ADN-ului, în cursul colorării cu coloranţi bazici) timp de 7 minute, la temperatura de 60^0 C. Se spală apoi lama într-o baie cu apă de robinet, schimbându-se apa de două ori;
- ✓ colorarea frotiului cu soluţie Giemsa 1/20, timp de 1-3 minute (prepararea soluţiei Giemsa este dată în Anexă);

✓ lama se spală apoi cu apă de robinet, se usucă şi se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

Citoplasma apare colorată în roz iar elementele nucleare în roşu-violaceu.

➢ ***Metoda Bradshaw* (pentru evidenţierea nucleului la drojdii)**

Materiale necesare:

- cultură de *Saccharomyces cerevisiae* (12 ore) pe mediul Sabouraud înclinat;
- soluţie de alcool etilic 40 %;
- soluţie de KOH 0,1 N;
- soluţie de alcool etilic 10 %;
- soluţie 0,1 % de albastru de toluidină (în alcool etilic 10%).

Tehnica de lucru:

✓ se execută o suspensie mai puţin densă din cultura de levuri;
✓ se prepară un frotiu din suspensia obţinută care se lasă să se usuce la aer, apoi se fixează uşor prin căldură;
✓ se acoperă lama cu alcool etilic 40 % timp de 1 minut şi apoi se spală cu apă de robinet;
✓ se acoperă frotiul cu soluţie de KOH 0,1 N şi se lasă să acţioneze timp de o oră (se completează cu soluţie proaspătă în caz de evaporare) după care se spală cu apă de robinet;
✓ lama se acoperă cu soluţie de albastru de toluidină 0,1 % care se ţine 2 minut;
✓ se spală colorantul de pe lamă cu alcool etilic 10 % şi se usucă apoi la aer.

În mod asemănător se prepară un al doilea frotiu la care nu se aplică tratamentul cu alcool etilic 40 % şi cel cu KOH 0,1 N ci doar colorarea cu albastru de toluidină timp de 2 minute. Cel de al doilea preparat ne indică dacă înainte de aplicarea colorantului este necesară hidroliza prealabilă a ARN-ului prin tratamentul cu alcool etilic şi KOH.

Colorarea incluziunilor citoplasmatice

Prin incluziuni se înţeleg, de obicei, substanţele inerte depuse în citoplasma celulei. După natura lor aceste incluziuni sunt de mai multe feluri:

a) Incluziunile de volutină - au fost descoperite de V. Babeş în 1887 la *Corynebacterium diphtheriae* şi *Mycobacterium tuberculosis* şi apoi de Ernst în 1889 la alte specii şi alge cianoficee (*Cyanobacterii*). Denumirea de granulaţii de volutină a fost dată de Grimm datorită faptului că se întâlnesc în număr foarte mare la *Spirillum volutans*. Adesea, în literatură sunt denumite granulaţiile lui Babeş-Ernst. Incluziunile de volutină sunt caracteristice pentru genurile *Corynebacterium, Spirillum* şi *Azotobacter*. Au o formă sferică, cu diametrul de câteva sute de Å până la 0,5 μm şi sunt formate din polifosfaţi, ARN şi proteine. Rolul acestor incluziuni nu este pe deplin cunoscut. Unii autori le atribuie rol de substanţe de rezervă, alţii le consideră ca produse rezultate din metabolisme. Un lucru apare de necontestat şi anume faptul că ele intervin în metabolismul fosforului.

Incluziunile de volutină (granulele metacromatice) au o mare afinitate pentru coloranţii bazici (de exemplu, albastru de metilen). Atunci când se utilizează un colorant bazic la colorarea unui microorganism ce conţine granule metacromatice, coloraţia granulelor va fi mai intensă comparativ cu restul celulei. În unele celule, aceste incluziuni au aspectul unui şirag de mărgele în timp ce în alte celule, pot fi plasate la capătul acestora.

Granulele metacromatice sunt prezente la numeroase bacterii, dar de prim interes microbiologic este *Corynebacterium diphtheriae* care produce la om difteria. Genul *Corynebacterium* cuprinde şi numeroase specii nonpatogene (difteromorfe) ca de exemplu, *Corynebacterium pseudodiphthericum*, lipsit de astfel de granulaţii.

Pentru punerea în evidenţă a incluziunilor de volutină (granulelor metacromatice) s-au descris mai multe metode.

➢ ***Metoda Neisser***

Materiale necesare:

- colorant Neisser- format din două soluţii (vezi Anexa);
- soluţie Lugol-lactat (se prepară din soluţie Lugol 100 ml şi 1 ml acid acetic concentrat sau acid lactic);
- soluţie crizoidină 1% sau vezuvină 0,2%;
- culturi de *Corynebacterium diphtheriae* (18-24 ore).

Tehnica coloraţiei:

✓ se execută un frotiu bacterian din cultura bacteriană de analizat;

- ✓ după uscare şi fixare, frotiul se colorează cu colorantul Neisser timp de 1-2 minute;
- ✓ se spală, se acoperă cu soluţie Lugol lactat timp de 30 secunde;
- ✓ se spală şi se colorează timp de 30 secunde preparatul cu soluţie de crizoidină 1% sau vezuvină 0,2%;
- ✓ frotiul astfel colorat se spală, se usucă, se examinează la imersie.

Corpul bacterian apare colorat în galben-brun iar corpusculii metacromatici în albastru.

➢ ***Metoda Albert***

Materiale necesare:
- colorant Albert (vezi Anexa);
- soluţie Lugol;
- infuzie de fân - se obţine din resturi organice (frunze uscate, paie etc.) puse într-un vas cu apă de robinet care se închide cu un dop de vată. Se păstrează la temperatura camerei (sau la 37^0 C) timp de 5 zile, barbotându-se din când în când cu un tub de cauciuc. Pentru a favoriza dezvoltarea microorganismelor (bacterii spiralate foarte bogate în volutină, prezente în mod frecvent în infuzia de fân) se mai poate introduce extract de carne.

Tehnica de lucru:
- ✓ se execută un frotiu din infuzia de fân, care se usucă şi se fixează;
- ✓ se colorează cu colorantul Albert timp de 5 minute, încălzindu-se uşor fără a ajunge la fierbere, după care se îndepărtează;
- ✓ fără a spăla frotiul se adaugă soluţie Lugol care se ţine timp de 1 minut, după care se varsă, se spală, se usucă şi se examinează la microscop la obiectivul cu imersie.

Incluziunile de volutină apar sub forma unor corpusculi sferici colorați în albastru intens, iar citoplasma colorată în verde pal.

b) Incluziunile de glicogen

Incluziunile de glicogen fac parte alături de incluziunile de amidon din categoria incluziunilor polizaharidice şi se colorează în brun cu soluţie Lugol. Ele pot fi uşor puse în evidenţă la *Clostridium pasteurianum, Azotobacter* sp. şi la levuri. La aceste specii se constată că pe măsură ce celulele îmbătrânesc, numărul incluziunilor de glicogen creşte. Se pare că au rol de sursă de energie.

Materiale necesare:

- lame de microscop;
- lamele;
- pipete Pasteur;
- soluție Lugol;
- culturi de *Saccharomyces cerevisiae* (20 ore) pe mediul Sabouraud înclinat.

Tehnica de lucru:

Pentru punerea în evidență a incluziunilor de glicogen la drojdii se execută preparate între lamă şi lamelă în care se pune o picătură de soluție Lugol. Se lasă 5-10 minute, apoi se examinează la obiectivul de 40 x.

Celulele vor apare colorate în galben iar incluziunile se vor colora în brun închis.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

6. METODE DE MICROSCOPIE UTILIZATE ÎN MICROBIOLOGIE

Datorită dimensiunilor lor extrem de mici, microorganismele nu au putut fi observate şi descrise decât odată cu descoperirea unor sisteme optice capabile să le facă vizibile printr-o mărire suficientă a imaginii lor.

Dacă primele încercări de combinare a lentilelor sunt de dată foarte veche (Roger Bacon, secolul al XIII-lea şi Galileu, secolul al XVI-lea), descoperirea microscopului şi descrierea primelor microorganisme se datoresc lui Antoni van Leeuwenhoek (1863) – Fig. 38.

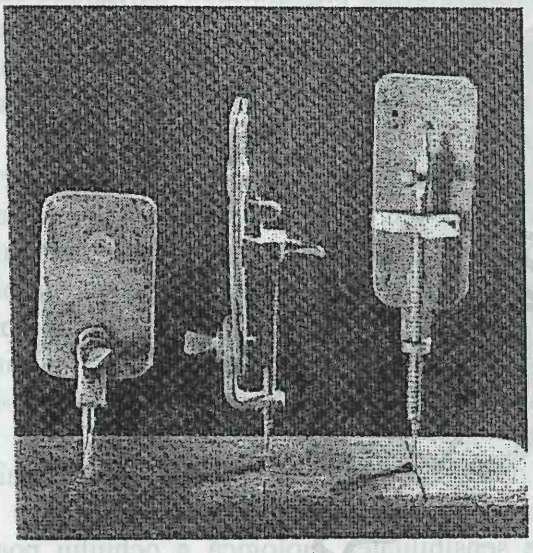


Fig. 38 – Microscopul simplu (cu o singură lentilă) al lui Antoni van Leeuwenhoek

În secolul al XVII-lea Robert Hooke aduce microscopului prima perfecţionare importantă, care constă în introducerea iluminării artificiale a obiectului şi concentrarea luminii cu ajutorul unui sistem optic.

În secolul al XIX-lea şi mai ales în secolul al XX-lea, odată cu dezvoltarea tehnicii, s-au construit numeroase tipuri de microscoape, din ce în ce mai perfecţionate, ceea ce a reprezentat unul dintre factorii determinanţi ai acumulării cunoştinţelor actuale asupra microorganismelor.

Înţelegerea principiilor care stau la baza construirii diferitelor tipuri de microscoape, a modului de formare a imaginii şi în ultimă instanţă a posibilităţilor, limitelor şi modului de folosire cu maximă eficienţă a fiecărui tip, necesită recapitularea câtorva probleme referitoare la proprietăţile radiaţiilor şi a câtorva noţiuni elementare de optică microscopică.

Microscoapele utilizate cel mai frecvent astăzi sunt împărţite în

două categorii: microscoape fotonice şi microscoape electronice. Microscoapele optice, la rândul lor, pot fi microscoape cu fond clar, microscoape cu fond întunecat, microscoape cu fluorescenţă, microscoape cu contrast de fază, în timp ce microscoapele electronice pot fi cu transmisie (MET), cu baleiaj (MEB) etc.

6.1. MICROSCOPUL FOTONIC CU FOND CLAR

Microscopul este un instrument optic special construit cu scopul de a mări şi prin aceasta de a permite observarea obiectelor foarte mici şi pentru a „rezolva" detaliile foarte fine ale preparatului, permiţând astfel evidenţierea unor amănunte de structură fine şi apropiate. El îndeplineşte acest scop datorită faptului că formează o imagine mărită a obiectului, perceptibilă pentru ochi şi că are o putere de rezoluţie (de separare vizuală) mult mai mare decât a ochiului liber.

Microscopul fotonic este un instrument complex în care toate părţile componente formează un ansamblu unitar care concură la realizarea unei imagini cât mai bune a preparatului. El este alcătuit dintr-o **parte mecanică** (piciorul microscopului, platina cu sistemele ei de deplasare în plan orizontal şi tubul microscopic care poate fi deplasat în sus şi în jos prin intermediul unor angrenaje – vizele micro- şi macrometrice) şi **o parte optică**, formată din sistemul de iluminare şi sistemul optic propriu-zis (obiectivele şi ocularele).

Spectrul vizibil utilizat de microscopul fotonic formează numai o mică parte dintr-un spectru mai larg de radiaţii electromagnetice şi corespunde limitelor între care sensibilitatea biologică a ochiului poate înregistra imaginile furnizate. El este cuprins între 400-700 nm (respectiv 4000-7000 Å) şi poate fi divizat în funcţie de lungimea de undă care determină culoarea radiaţiilor în mai multe zone:

- violet (400 nm), albastru (400-500 nm);
- albastru-verde (500 nm), verde (500-600 nm);
- galben (600 m), galben-portocaliu (600-700 nm), roşu (700 nm).

Celelalte zone ale spectrului, invizibile pentru ochi, pot fi folosite în microscopie, cu condiţia introducerii în sistemul optic a unui dispozitiv menit să „genereze" lungimi de undă situate în zona vizibilă, ca de exemplu placa fotografică pentru radiaţiile ultraviolete sau ecranul fluorescent pentru microscopul electronic.

Părţile componente ale microscopului optic

În Fig. 39 sunt prezentate părţile componente ale microscopului optic.

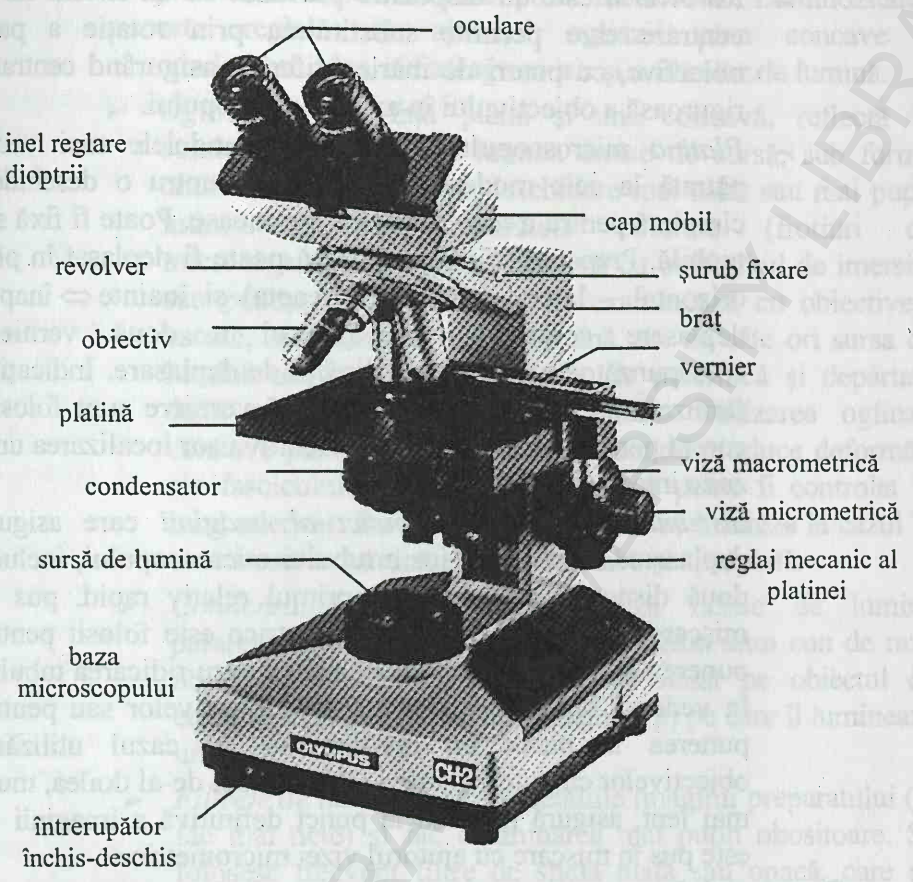


Fig. 39 – Părțile componente ale microscopului optic

Partea mecanică

- *Piciorul sau baza* microscopului fotonic, care susține întregul aparat, este reprezentat de un suport metalic greu, în formă de V sau U la modelele clasice, sau de formă rectangulară, având încorporat sistemul de iluminare, la cele moderne. Pe placa bazală este articulat sau solid legat prin construcție, corpul microscopului propriu-zis. La microscoapele moderne, tendința constructorilor este aceea de a concentra toate dispozitivele de comandă spre baza stativului, astfel încât mâna observatorului execută mișcări limitate, evitând oboseala. Tubul care leagă ocularul și obiectivul la microscoapele clasice a fost păstrat la microscoapele monoculare și a dispărut practic la

microscoapele moderne binoculare.

- *Revolverul* este un dispozitiv prevăzut cu un sistem fin de centrare care permite substituirea prin rotație a patru obiective, cu puteri de mărire diferite, asigurând centrarea riguroasă a obiectivului în axul microscopului.
- *Platina* microscopului, rotundă la modelele mai vechi, pătrată la cele moderne, prezintă în centru o deschidere circulară pentru trecerea razelor luminoase. Poate fi fixă sau mobilă. Preparatul fixat pe platină poate fi deplasat în plan orizontal – lateral (stânga ⇔ dreapta) și înainte ⇔ înapoi, deplasare controlată cu ajutorul a două verniere, corespunzătoare celor două direcții de deplasare. Indicațiile furnizate de cifrele de pe cele două verniere sunt folosite curent pentru a preciza și repera relativ ușor localizarea unei zone interesante din preparat.
- *Sistemul de punere la punct al imaginii* care asigură deplasarea în sus și în jos a tubului microscopului, include două dispozitive dintre care primul relativ rapid, pus în mișcare cu ajutorul vizei macrometrice este folosit pentru punerea la punct cu obiective slabe, pentru ridicarea tubului în vederea schimbării sau curățirii obiectivelor sau pentru punerea la punct cu aproximație, în cazul utilizării obiectivelor cu putere mare de mărire. Cel de-al doilea, mult mai lent, asigură punerea la punct definitivă a imaginii și este pus în mișcare cu ajutorul vizei micrometrice.

Partea optică

Partea optică a microscopului este constituită din două sisteme: sistemul de iluminare și sistemul optic propriu-zis.

- *Sistemul de iluminare*. În afară de calitățile sistemului optic, claritatea imaginii este influențată de iluminarea preparatului. Pentru a obține o imagine de înaltă calitate optică este necesară o sursă de lumină suficient de puternică și omogenă și o diafragmă de câmp, care să permită limitarea câmpului iluminat la câmpul observat.
- *Sursa de lumină*, folosită de microscopul electronic obișnuit, este reprezentată de energia radiantă luminoasă (fotonii) a spectrului vizibil, cu o lungime de undă cuprinsă între 400-700 nm furnizată de lumina solară sau de un bec electric. Pentru microscopul binocular, la care din cauza absorbției produsă de prismă, cantitatea de lumină care

ajunge în fiecare tub este de numai aproximativ 1/3 din cea primită de tubul microscopului monocular. Luminozitatea este reglată cu ajutorul oglinzii plan concave a condensatorului, a diafragmei iris şi a filtrelor de lumină.

- *Oglinda*, cu o faţă plană şi una concavă, reflectă în condensator razele de lumină emise de sursă, sub forma unui con luminos, cu o deschidere mai mult sau mai puţin întinsă. Pentru preparatele colorate (frotiuri cu microorganisme), care se observă cu obiectivul de imersie, sau pentru suprafeţele care se examinează cu obiectivele uscate, se utilizează oglinda plană, ori de câte ori sursa de lumină artificială este suficient de puternică şi depărtată dacă se foloseşte lumina naturală. Utilizarea oglinzii concave pentru o sursă bună de lumină produce deformări ale fasciculului luminos care nu mai poate fi controlat în mod adecvat. De aceea, ea trebuie să se limiteze la cazul în care sursa de lumină este foarte slabă şi apropiată.
- *Condensatorul Abbe** concentrează razele de lumină paralele, reflectate de oglindă, sub forma unui con de raze oblice care converg într-un focar situat pe obiectul de cercetat (la nivelul lamei de microscop) pe care îl luminează uniform.
- *Filtrele de lumină* întăresc detaliile imaginii preparatului (le fac mai nete) şi fac examinarea mai puţin obositoare. Se folosesc frecvent filtre de sticlă mată sau opacă, care au dezavantajul unei structuri granulare şi de a absorbi o cantitate importantă de lumină sau filtre de sticlă colorată.
- *Ocularul* microscopului este un sistem optic, având forma unui mic cilindru, care se introduce în partea superioară a tubului microscopului (înspre ochiul observatorului) şi care are rolul de a mări imaginea dată de obiectiv, de a corecta unele defecte ale obiectivului şi în cazuri speciale de a proiecta imaginea unui fir indicator sau a unei scale, localizate în interiorul său.

*Unii autori au propus înlocuirea termenului de *condensator* folosit curent în literatura franceză, cu acela de *condensor,* pentru a evita exprimarea ambiguă datorită existenţei condensatorilor electrici. Propunerea este nejustificată deoarece condensatorii electrici nu sunt folosiţi în microscopia fotonică, iar termenul de condensor are echivalentul la maşinile cu abur. Autorul primului condensator optic, Dujardin (1843) l-a numit « concentrator ».

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

Ocularele sunt compuse din două lentile, simple sau compuse, montate la cele două extremități ale unui cilindru, dintre care cele aşezate în partea superioară (înspre ochi) au rol de mărire, iar cele aşezate în partea opusă reprezintă lentila (sau lentilele) de câmp. Oculare sunt împărțite convențional în două categorii:

- oculare care servesc pentru observarea directă (cu ochiul) şi care dau o imagine la infinit pentru un observator care are ochiul normal;
- oculare care formează o imagine reală, la o distanță mică, fie pe un ecran, fie pe o placă fotografică.

Cu cât ocularul este mai puternic, imaginea pierde din claritate şi din întindere, conturul obiectelor observate devine mai puțin net, fără ca puterea de rezoluție să crească. De aceea, se recomandă ca pentru activitatea curentă să se folosească un obiectiv puternic şi oculare cu putere de mărire mică sau mijlocie.

- *Obiectivul* microscopului este un sistem optic constituit dintr-o serie de lentile dispuse într-un tub cilindric înşurubat cu partea superioară în revolverul schimbător de obiective,destinat să funcționeze în imediata apropiere a obiectului de examinat. Se deosebesc două categorii de obiective: uscate şi umede (cu imersie). Aceste obiective diferă prin natura mediului interpus între lentila frontală a obiectivului şi obiectul de examinat.

- *obiectivele uscate* – sunt obiective la care mediul interpus între lentila lor frontală şi preparat este aerul. Datorită indicelui de refracție (n) diferit (aer n=1, sticla n=1,5) razele luminoase care provin din obiect, dacă sunt suficient de oblice, suferă refracția sau chiar reflexia totală la limita de separare lamă-aer. Unghiul limită care determină reflexia totală nu permite ca deschiderea numerică (care exprimă unghiul maxim sub care razele care ies direct pot pătrunde în interiorul sistemului optic) să fie mai mare ca 1. În consecință, aceste obiective au o putere de mărire mai slabă, deoarece mărirea utilă este proporțională cu deschiderea numerică. Obiectivele sunt notate cu cifrele 4x, 10x, 20x şi 40x, fiind utilizate pentru studiul fungilor, a celulelor vegetale şi animale;
- *obiectivele cu imersie* - se numesc astfel deoarece se folosesc interpunând între lentila lor frontală şi preparat un ulei de imersie având un indice de refracție (n), apropiat de al sticlei (n=1,5). Cel mai folosit în practică este uleiul de cedru având

n=1,51 (balsamul de Canada are n=1,53 iar uleiul de parafină 1,47) - Fig. 40. Necesitatea folosirii obiectivelor cu imersie decurge din faptul că atunci când o rază de lumină oblică trece dintr-un mediu dens (lama de sticlă), într-un mediu mai puțin dens (aerul), ea este refractată sub un unghi mare față de normală, care nu-i permite să pătrundă în lentila obiectiv (Fig. 41). Obiectivul de 100 x (imersie) și uleiul de cedru se utilizează pentru studiul bacteriilor, levurilor (Fig. 42).

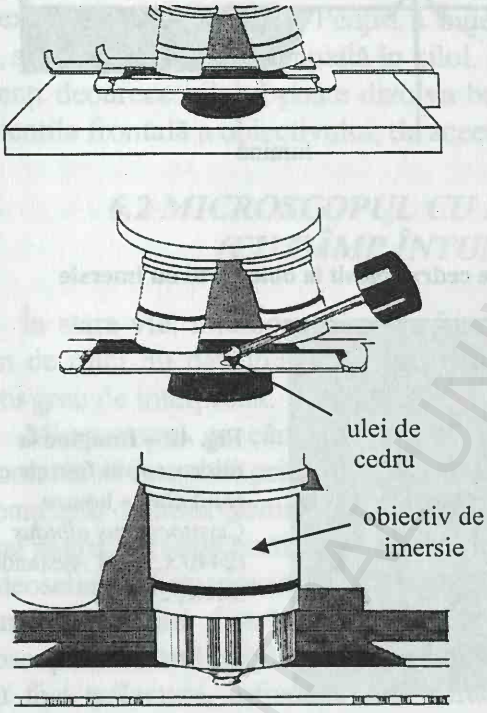


Fig. 40 – Utilizarea uleiului de cedru în microscopia fotonică

Puterea de mărire a microscopului este rezultatul puterii de mărire a obiectivului înmulțită cu cea a ocularului (de exemplu, 10 x-ocular X 100 x-obiectiv imersie = 1000 x).

Pentru obiectivele cu imersie, după ce am asigurat o bună iluminare și o centrare perfectă, se pune preparatul de examinat pe platină și se fixează cu cei doi cavaleri, apoi se pune o picătură de ulei de cedru pe lamă și se coboară tubul microscopului cu ajutorul vizei macrometrice, până ce, privind lateral, lentila frontală a obiectivului de imersie ajunge în contact cu picătura de ulei de cedru. Din acest moment vom privi prin ocular și vom continua mișcarea de coborâre a tubului cu ajutorul vizei micrometrice pentru a pune la punct imaginea.

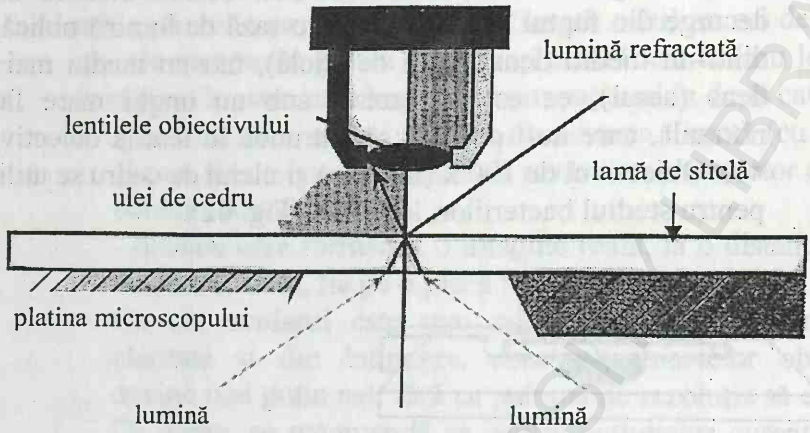


Fig. 41 – Funcția uleiul de cedru folosit la obiectivul cu imersie

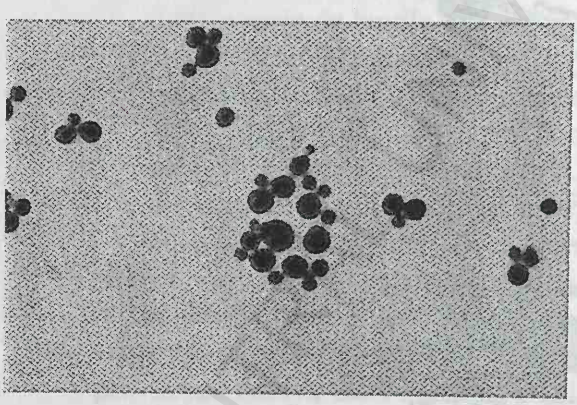


Fig. 42 – Imagine la microscopul fotonic cu fond clar – levura *Cryptococcus albidus* (2440 x, după Alexander, Strete, 2001)

După terminarea examenului, înainte de a scoate lama de pe platină, se va ridica tubul cu ajutorul vizei macrometrice pentru a evita zgârierea lentilei frontale a obiectivului. Uleiul de cedru de pe obiectivul cu imersie se va şterge cu pulpa degetului. Microscopul se va pune la adăpost de praf (sub husă sau în cutie).

Pentru examinarea unui preparat umed, necolorat, între lamă şi lamelă vom utiliza obiective uscate (20 x sau 40 x) sau obiectivul cu imersie (100 x), coborând condensatorul şi ținând platina microscopului orizontală pentru a nu se scurge lichid de examinat.

Uneori, nu se pot obține imagini microscopice clare; acestea se datoresc, printre altele, lipsei de centrare perfectă a obiectivului, examinarea preparatului pe dos, oculare şi obiective murdare, defecte de

centrare a luminii, diafragmul condensatorului închis etc.

Întreținerea microscopului

Microscopul trebuie ferit de praf, vapori de acizi, umezeală. Se păstrează în cutia lui, sub un clopot de sticlă sau husă de plastic.

Ştergerea lentilelor ocularului se va face cu o cârpă moale care nu lasă scame sau, mai bine, cu piele de căprioară. În privința obiectivelor, o deosebită atenție trebuie acordată obiectivelor cu imersie. Uneori, din neatenție, lentila frontală a acestui obiectiv poate fi lovită, dar mai ales se întâmplă ca aceasta să fie murdărită cu ulei de cedru care se usucă, jenând astfel examenul microscopic. Pentru a îndepărta uleiul de cedru întărit pe lentile, se utilizează o cârpă muiată în xilol. La ştergerea lentilelor trebuie să fim atenți deoarece xilolul poate dizolva balsamul de Canada cu care este fixată lentila frontală a obiectivului; de aceea se preferă cloroformul.

6.2 MICROSCOPUL CU FOND NEGRU (CU CÂMP ÎNTUNECAT)

În stare vie, microorganismele foarte transparente şi de dimensiuni extrem de mici nu dau imagini în microscopul obişnuit sau dau cel mult imagini greu de interpretat.

Microscopul cu câmp negru (cu lumină indirectă) măreşte foarte mult contrastul imaginii prin folosirea unui dispozitiv de iluminare laterală a preparatului datorită căruia câmpul microscopic, neprimind lumină directă rămâne negru, pe când particulele-obiect, luminate, apar strălucitoare. Deci, spre deosebire de microscopul cu câmp clar, în care razele emise de sursa de lumină pătrund direct în aparat după ce au străbătut obiectul, în microscopul cu fond negru razele luminoase pătrund numai indirect, după ce au fost reflectate, refractate sau difractate de obiect. În felul acesta, obiectul de examinat devine o sursă secundară de lumină şi apare ca şi cum ar lumina el însuşi pe un fond întunecat.

Pentru efectuarea examenului pe fond negru se înlocuieşte condensatorul Abbe al microscopului obişnuit cu un condensator special, paraboloid sau cardioid. Acest condensator este prevăzut cu un sistem de oglinzi sau lentile care dau razelor ce pătrund în condensator o înclinare oblică față de axul optic al microscopului. În acest fel, obiectul de examinat este luminat lateral şi nici o rază de lumină nu pătrunde direct în obiectiv.

Pentru ca efectul de fond negru să fie cât mai net, trebuie ca obiectul de cercetat, care se află în axul optic al obiectivului, să se afle în acelaşi timp în punctul de convergență al tuturor razelor care pătrund în preparat. În acest scop este necesară o centrare perfectă a condensatorului.

Pentru a împiedica reflexia totală a celor mai oblice raze care pătrund prin condensatorul de fond negru în lama port-obiect se va stabili o legătură optică între lamă şi faţa superioară a condensatorului, cu ajutorul uleiului de cedru.

Lamele şi lamelele întrebuinţate vor trebui să fie foarte curate, de preferinţă noi, fără zgârieturi. Ele vor fi bine spălate, ţinute în alcool şi şterse cu o cârpă care nu lasă urme. Un procedeu bun este ca, după spălare, să se introducă lamele în colodiu; când acesta este aproape uscat, se va dezlipi antrenând astfel şi particulele de praf ce se găsesc pe lamă.

Sursa de lumină va fi, de preferinţă, o lampă cu filament punctiform de voltaj scăzut şi amperaj mare.

Prin folosirea microscopiei pe fond negru, puterea de rezoluţie este mărită faţă de cea a microscopului obişnuit.

Examenul la microscopul pe fond negru se foloseşte pentru cercetarea spirochetelor şi leptospirelor în produsele patologice şi culturi (Fig. 43).

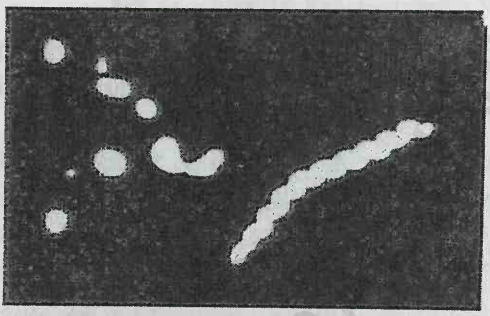


Fig. 43 – *Treponema pallidum* – imagine la microscopul cu fond negru (după Wistreich, 1999)

Tehnica observării la microscopul cu fond negru

După înlocuirea condensatorului obişnuit cu un condensator paraboloid sau cardioid, asigurându-se de o bună sursă de lumină şi de o perfectă centrare a condensatorului, preparatul de examinat se fixează pe platina microscopului, punându-se în prealabil o picătură de ulei de cedru pe faţa superioară a condensatorului de fond negru, care a fost coborât.

Se ridică condensatorul şi se stabileşte contactul cu lama port-obiect prin intermediul uleiului de cedru.

Se priveşte cu un obiectiv slab şi se centrează lumina în aşa fel încât să obţinem un punct luminos cât mai redus pe faţa superioară a condensatorului.

Se înlocuieşte obiectivul slab cu un obiectiv puternic. În cazul examinării cu obiectiv cu imersie, vom avea grijă să punem o picătură de ulei de cedru şi pe faţa superioară a lamelei ce acoperă preparatul.

Când s-a obţinut o bună centrare, câmpul microscopic este perfect

negru, iar obiectele de examinat apar strălucitoare, animate de mişcări browniene sau mişcări orientate, în cazul microorganismelor mobile.

6.3. MICROSCOPUL CU CONTRAST DE FAZĂ

Cu unele excepţii (sporii fungilor care conţin pigmenţi cu rol de absorbţie a luminii sau cloroplastele care conţin pigmenţi fotosintetici), preparatele biologice studiate la microscopul fotonic cu câmp clar, în stare vie, apar ca lipsite de structură, datorită lipsei de contrast propriu. Aceasta face ca detaliile interne să fie greu de evidenţiat. În cazul microorganismelor, una din dificultăţile examinării în stare vie o constituie, pe lângă dimensiunile lor mici, faptul că au un indice de refracţie foarte apropiat de cel al lichidului în care sunt suspendate.

Se ştie că un obiect incolor aflat într-un mediu incolor, sau un obiect colorat aflat într-un mediu cu aceeaşi culoare, pot fi percepute vizual numai dacă diferă de mediul lor, printr-o capacitate diferită de absorbţie a luminii, datorită unei grosimi sau a unui indice de refracţie deosebit. Când această diferenţă este suficient de mare, obiectul poate fi văzut uşor la microscopul cu câmp clar. În cazul celulelor bacteriene vii, diferenţele naturale dintre obiect şi mediul său, în ceea ce priveşte refringenţa şi capacitatea de transmitere a luminii (determinată de grosime) sunt foarte mici. Ca urmare, razele de lumină care le traversează nu îşi modifică amplitudinea, dar suferă o întârziere (o rămânere în urmă a unora, în raport cu altele), care dă naştere la diferenţe de fază între undele care formează imaginea. Datorită faptului că ochiul uman nu sesizează aceste diferenţe de fază, detaliile de structură nu pot fi evidenţiate, decât dacă contrastul lor (respectiv capacitatea de a absorbi razele de lumină) este amplificată în mod artificial prin fixare şi colorare. Acest procedeu are însă dezavantajul că implică omorârea bacteriilor şi fixarea lor într-un anumit stadiu metabolic, la care se adaugă riscul apariţiei unor modificări structurale sau a unor structuri false, datorate precipitării proteinelor celulare.

Microscopul cu contrast de fază se bazează pe defazarea (întârzierea) în mod variat a undei luminoase de către diferitele părţi ale unui preparat. Noţiunea de "fază" se leagă astfel de faptul că lumina îşi micşorează viteza când trece dintr-un mediu de refracţie slab în altul cu indici de refracţie mai mari. Metoda microscopică prin contrast de fază are deci scopul de a face să varieze contrastele în imagini folosind diferenţele de absorbţie şi de viteză a razelor luminoase în sistemul optic al microscopului.

Microscopul cu contrast de fază este prevăzut cu obiective speciale care conţin în interiorul lor, centrat pe axul lor optic, câte o placă de sticlă

cu un şanţ circular de o anumită adâncime (inelul sau placa de fază). În afară de aceasta, microscopul este prevăzut cu un condensator special care are diafragme cu deschidere inelară, de diametre variabile şi care răspund fiecare pentru câte un obiectiv, fiind necesare pentru iluminarea inelului de fază din interiorul obiectivului.

Punerea în funcţiune a microscopului cu contrast de fază comportă următorii paşi:

♦ obiectivele obişnuite ale microscopului fotonic se înlocuiesc cu obiectivele de contrast de fază care au marcate pe montura lor literele F sau Ph;

♦ condesatorul obişnuit se înlocuieşte cu condensatorul cu revolver, destinat examenului cu contrast de fază; revolverul se învârteşte până când numărul diafragmului inelar al condensatorului corespunde cu numărul obiectivului întrebuinţat;

♦ preparatul de examinat se aşază pe platina microscopului, iar tubul microscopului se coboară până la poziţia de punere la punct;

♦ introducem în tub în locul ocularului, o lunetă specială cu viză care se află în cutia microscopului; aprindem lumina şi dăm oglinzii poziţia potrivită; privim prin lunetă mişcând segmentul superior, până când se văd clar inelul luminos al diafragmului condensatorului şi inelul întunecos al marginii plăcuţei de fază;

♦ învârtim vizele oblice ale condensatorului pentru contrast de fază până când cele două inele apar perfect concentrice;

♦ înlocuim luneta specială printr-un ocular obişnuit; punem la punct şi examinăm ca de obicei. Toate detaliile preparatului apar foarte clar.

Microscopia cu contrast de fază reprezintă o metodă extrem de utilă în biologie în general şi în microbiologie în special. Ea este utilizată în practică pentru decelarea şi localizarea bacteriilor vii în ţesuturi, pentru studiul creşterii şi multiplicării, al sporulării, al mişcării flagelilor, al fenomenului de bacteriofagie, al urmăririi efectului diferitelor antibiotice ca şi pentru observarea dinamică a diferitelor structuri celulare fine, având avantajul de a permite studiul microorganismelor vii, fără nici o intervenţie care le-ar putea modifica sau altera aspectul natural al structurii lor.

6.4. MICROSCOPUL CU RAZE ULTRAVIOLETE

Microscopul cu raze ultraviolete (UV) foloseşte o optică specială, permeabilă la UV (cuarţ sau sticlă de tip special) şi obiective corectate pentru lumina vizibilă necesare pentru punerea la punct a imaginii.

Microscopul cu fluorescenţă înlocuieşte lumina albă (λ=400-700

nm), cu cea ultravioletă (UV) (275 nm). În timp ce constituenții celulelor vii sunt transparenți și incolori pentru lumina albă, ei se comportă diferit față de radiațiile UV, pe care în funcție de compoziția lor chimică le absorb în diferite grade, mărind contrastul imaginii și permițând evidențierea și localizarea chiar în celula vie, a unor structuri invizibile în lumina albă.

Întrucât ochiul omenesc nu este sensibil din punct de vedere optic la UV, imaginile obținute sunt reproduse pe plăci fotografice sau proiectate pe un ecran de televiziune. Microscopul cu UV are deci dezavantajul că nu permite examenul direct al preparatelor.

- ***Microscopul cu fluorescență***

Microscopul cu fluorescență se bazează pe fenomenul de fluorescență, prin care unele substanțe numite fluorescente, iradiate de un fascicul de raze cu o lungime de undă mică și frecvență înaltă, emit alte radiații cu o lungime de undă mai mare și o frecvență mai joasă, deci de o culoare diferită. Fenomenul poate fi pus în evidență mai bine prin folosirea ca sursă de lumină a razelor UV (λ=300-400 nm) care sub influența substanțelor fluorescente se transformă în raze fluorescente (cu o energie mai mică dar cu λ mai mare, formând o imagine care impresionează placa fotografică sau este vizibilă, cu ochiul protejat de un filtru pentru UV).

Există două tipuri de fluorescență:

- *Fluorescența primară* (*autofluorescența, fluorescența naturală*) – în care obiectele emit direct această lumină, sub influența fluxului excitator, datorită prezenței în compoziția lor a unor substanțe capabile de fluorescență (unii pigmenți bacterieni, clorofile etc.);
- *Fluorescența secundară*, mai intensă, nu este emisă direct de un obiect, ci numai după ce a fost impregnat cu substanțe speciale numite fluorocromi. Fluorocromii cei mai folosiți în microbiologie sunt auramina, acridina, rodamina B, tripaflavina, fluoresceina și derivații ei. Culoarea fluorescentă dată de ei este variabilă (verde închis sau deschis, galben, portocaliu etc.).

În esență, fenomenul de fluorescență are următorul substrat: absorbind energia luminoasă care cade asupra lor, moleculele substanțelor fluorescente ajung într-o stare de excitație moleculară, datorită trecerii electronilor din atomii lor la un nivel energetic superior, prin migrarea lor treptată, pe orbite situate mai departe de nucleu. Această stare a moleculelor este instabilă, astfel că ele revin spontan la un nivel energetic mai scăzut o

parte din energia luminoasă fiind redată în mediul exterior, tot sub formă de radiații luminoase, dar cu o modificare a energiei și a lungimii de undă. La microscopul cu fluorescență nu apar particule iluminate, ci particule care «luminează» ele însile, pe un fond închis.

Microscopia cu fluorescență se deosebește de microscopul cu UV, pentru că la acesta din urmă, razele UV invizibile pentru ochi, trec prin lentile optice speciale și prin preparat, pentru a da, ca urmare a unor coeficienți de absorbție diferiți, o imagine invizibilă pentru ochi, dar care poate fi înregistrată pe o placă fotografică.

Avantajele microscopiei cu fluorescență:

- ✓ permite cercetarea microorganismelor în stare vie și detectarea lor în celule și țesuturi;
- ✓ prezintă risc mic de apariție a unor artefacte deorece nu necesită fixarea preparatelor, iar fluorocromii sunt folosiți în diluții foarte mari.

Dezavantaje:

- ✓ necesită instalații speciale (sursă specială de lumină) și optică specială;
- ✓ aspectul structurilor evidențiate prin fluorescență poate fi uneori foarte diferit de acela care apare consecutiv utilizării altor tehnici, fapt ce complică interpretarea observațiilor.

Precauții:

- ✓ se va evita utilizarea unui microscop fără filtru, deoarece razele UV au o acțiune nocivă asupra ochiului uman, putând produce oftalmii inflamatorii și leziuni ale corneei;
- ✓ intensitatea luminii fluorescente fiind slabă, se recomandă ca examinarea să se facă în cameră întunecată și după ce ochiul s-a adaptat bine la întuneric.

Aplicații practice

Microscopia cu fluorescență are aplicații în numeroase domenii ale biologiei. În microbiologie este folosită pentru evidențierea rapidă și sigură a microorganismelor pe frotiuri sau secțiuni histologice, chiar când sunt prezente în număr foarte mic. Aplicația cea mai frecventă și mai importantă este legată de testele de imunofluorescență, în care substanțele fluorescente servesc ca "trasor" pentru moleculele de imunoglobulină – anticorp, permițând evidențierea și localizarea "in vivo" a unor proteine străine, virusuri sau microorganisme, iar în imunobiologie permițând evidențierea celulelor în care are loc procesul de anticorpogeneză.

Principiul reacțiilor de imunofluorescență: Fluorocromii (ex. izotiocianatul de fluoresceină) adăugați la o soluție alcalină de anticorpi au proprietatea de a se «conjuga» chimic cu aceștia. După îndepărtarea

excesului de colorant prin dializă, anticorpii astfel marcați fluorescent își păstrează capacitatea de a se combina cu antigenele respective, ca un colorant imunochimic specific. Se produce astfel echivalentul unei reacții serologice tipice, în care antigenul (proteină străină, virus sau bacterie) este "colorat" specific de anticorpul corespunzător fluorescent iar prezența și localizarea sa este evidențiată cu foarte mare precizie.

Metoda directă (Fig. 44 a) se practică în două etape succesive:

a) substanța fluorescentă –izotiocianat de fluoresceină- este adăugată la un antiser și se obține marcarea anticorpilor respectivi;

b) anticorpii marcați sunt adăugați antigenului corespunzător și se obține o reacție specifică antigen-anticorp, însoțită de colorarea și evidențierea complexului.

Metoda indirectă (Fig. 44 b) nu folosește anticorpi marcați, ci recurge la un ser anti-anticorpi. Reacția se efectuează în trei etape succesive:

a) marcarea antiserului antiglobulinic (a anti-anticorpilor) cu izotiocianat de fluoresceină, care devine astfel o suspensie fluorescentă utilizabilă pentru evidențierea oricărui sistem antigen-anticorp;

b) punerea în contact a anticorpilor cu antigenul omolog și obținerea unui complex antigen-anticorp;

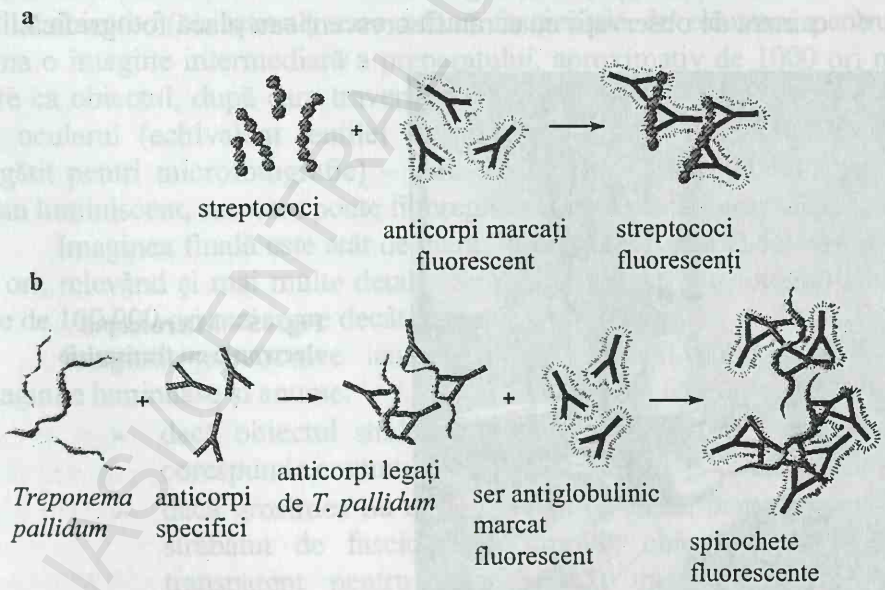


Fig. 44 – Reacțiile de imunofluorescență: a-metoda directă; b-metoda indirectă.

c) adăugarea serului antiglobulinic marcat (a anti-anticorpilor) la

complexul antigen-anticorp, urmată de colorarea specifică şi evidenţierea acestuia.

Metoda indirectă are marele avantaj că permite evidenţierea şi identificarea serologică a virusurilor şi microorganismelor în diferite medii naturale ca şi în ţesuturi, într-un timp scurt deoarece nu necesită prepararea de antiseruri specifice marcate: un singur tip sau cel mult două tipuri de seruri antiglobulinice marcate sunt suficiente pentru a studia numeroase sisteme antigen-anticorp diferite.

6.5. MICROSCOPUL ELECTRONIC CU TRANSMISIE

Microscopul electronic este un instrument construit după principiul microscopului fotonic, la care se folosesc în locul luminii, raze catodice sau electronice, iar lentilele sunt înlocuite cu câmpuri electrice sau magnetice.

Microscopul electronic (Fig. 45) prezintă următoarele componente:

- ✓ catodul care emite electronii;
- ✓ anodul care accelerează electronii;
- ✓ lentila electrică condensatoare;
- ✓ camera (ecluza) cu obiectul;
- ✓ obiectivul;
- ✓ lentila de proiecţie;
- ✓ camera de observaţii cu ecran fluorescent sau placă fotografică.

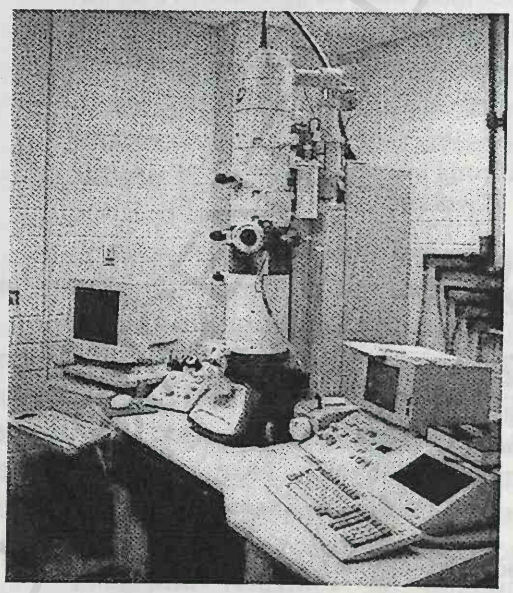


Fig. 45 – Microscopul electronic cu transmisie

Aparatul are diferite accesorii necesare unei bune funcţionări:

- ✓ pompa de vid înalt pentru ecluze în care se introduce obiectul de

examinat;
- ✓ sursa de curent de tensiune înaltă;
- ✓ stabilizatorii de tensiune etc.

Sursa de electroni este reprezentată de un catod generator de electroni prin termoemisie (un filament de tungsten), încălzit la incandescență, prin trecerea unui curent electric de înaltă frecvență. Undele electronice eliberate inițial cu viteză mică sub influența căldurii sunt transmise prin vid înalt (10^{-5} mm Hg) pentru a evita dispersia lor și o viteză accelerată considerabil, datorită unei diferențe de potențial de 50000-100000 volți (prezența aerului ar modifica traiectoria electronilor, în urma ciocnirilor moleculelor de aer, fapt care ar duce la slăbirea calității imaginilor).

Utilizarea unei tensiuni mari este neapărat necesară, deoarece pentru a crește puterea de rezoluție a microscopului sunt necesare unde cu lungimi cât mai scurte, iar lungimea de undă (λ) a fasciculului de electroni este în funcție de voltaj. În continuare, fasciculul de electroni traversează lentila condensator care îl grupează în fascicule foarte înguste și paralele, străbate vidul din camera obiectului și pătrunde în obiectul de examinat, așezat pe un suport de metal. Fasciculul de electroni care a traversat preparatul suferă, în funcție de natura și grosimea acestuia, devieri de la traseul său normal (devenind mai divergent), trece apoi prin cea de-a doua lentilă obiectiv (obiectivul) care adună fasciculele de electroni pentru a forma o imagine intermediară a preparatului, aproximativ de 1000 ori mai mare ca obiectul, după care traversează a treia lentilă – sistemul proiector sau ocularul (echivalent lentilei de proiecție a unui microscop fotonic pregătit pentri microfotografie) – care dă imaginea finală vizibilă, pe un ecran luminiscent, sau care poate fi înregistrată pe o placă fotografică.

Imaginea finală este atât de clară, încât poate fi mărită fotografic de 10 ori, relevând și mai multe detalii. Se realizează astfel o fotografie care este de 100.000 ori mai mare decât obiectul.

Imaginile electronice iau naștere în condiții puțin diferite de imaginile luminoase și anume:
- ➢ dacă obiectul studiat este opac la electroni, imaginea va corespunde conturului său;
- ➢ dacă grosimea nu este suficient de mică, pentru a putea fi străbătut de fasciculul electronic, obiectivul va deveni transparent pentru electroni, cu mențiunea că fiecare electron este mai mult sau mai puțin deviat în drumul său, în funcție de particularitățile fizico-chimice ale zonei prin care traversează preparatul; această variație se traduce pe

imaginea finală printr-o diferență de opacitate.

Acest mod de formare a imaginii justifică denumirea de microscop electronic cu transmisie dată microscopului electronic uzual numit și «convențional».

Preparatele biologice ce urmează a fi examinate la microscopul electronic trebuie să îndeplinească următoarelor condiții menite să asigure obținerea unor imagini de calitate, în condițiile particulare ale examinării lor:

- să fie astfel pregătite încât să-și păstreze toate caracteristicile structurale, în condițiile de examinare în vid și sub bombardamentul de electroni; acest lucru se realizează printr-o serie de operațiuni preliminare care includ recoltarea în condiții speciale, fixarea, deshidratarea, inculzionarea, secționarea etc.;
- să nu fie prea groase – respectiv să nu depășească grosimea de 30-40 nm în cazul secțiunilor ultrafine incluzionate;
- să nu fie nici prea subțiri, deoarece în aceste condiții s-ar obține o imagine insuficient contrastantă;
- să fie neutre față de electroni, adică să nu se încarce cu electricitate și să nu se ionizeze.

În mod curent, într-o primă etapă după recoltare, preparatele biologice (celule, fragmente de țesuturi sau organe) sunt fixate cu tetraoxid de osmiu (OsO_4) soluție 2% în tampon acetat veronal 2% la pH=7,2-7,4 (fixator Palade) sau cu glutaraldehidă, bicromat de potasiu, permanganat de potasiu. Fixarea este una dintre cele mai importante etape ale pregătirii preparatelor, deoarece poate determina apariția unor artefacte care duc la apariția unor imagini neconforme cu realitatea. Se recomandă să se facă în paralel mai multe tipuri de fixări, care să permită un studiu comparativ.

Preparatele fixate sunt deshidratate în băi succesive de alcool, cu concentrații progresiv crescânde (50^0, 60^0, 70^0, 90^0, alcool absolut) după care sunt incluzionate în rășini sintetice, care în anumite condiții au proprietatea de a se polimeriza. Se folosesc obișnuit metacrilații, araldita, vestopalul etc. Polimerizarea se face în capsule speciale de gelatină, în care preparatele sunt suficient de dure pentru a fi secționate după păstrare timp de 48 ore la 45^0 C. Secționarea se face la ultramicrotom cu ajutorul unor cuțite speciale de sticlă dură.

Preparatul de cercetat este montat pe un suport, care nu este o lamă de sticlă, ci o peliculă foarte fină (grosimea de 10 nm) lipsită de structură la microscopul electronic și reprezentată de un film de formvar (polivinil-formol diluat în diclorură de etilen) sau de parlodion. Membranele se obțin

prin evaporarea solventului dintr-un strat subțire al unei soluții diluate a materialului plastic, respectiv, depus pe suprafața unui lichid (apă distilată). Este necesar ca solventul să fie nemiscibil cu apa. În aceste condiții, dacă o picătură din soluția de formvar este depusă pe suprafața apei, într-un recipient, ea se etalează spontan într-un strat monomolecular, din care solventul se evaporă foarte repede. Membrana este apoi depusă pe o grilă de oțel inoxidabil, de aluminiu sau aur platinat cu găuri de 0,2 nm. Grila, pe lângă rolul de susținere a membranei are şi pe acela de absorbție şi dispersie a căldurii degajate în timpul examinării, datorită bombardamentului electronic la care este supus preparatul.

Preparatul este examinat prin orificiile grilei, după ce a fost introdus în camera portobiect printr-un sistem de ecluză (sas), pentru a evita pătrunderea aerului, ceea ce ar necesita refacerea vidului.

Ecranul fluorescent transformă imaginea dată de «lentila» proiectoare în imagine luminoasă, datorită faptului că sulfura de zinc sau de cadmiu cu care este acoperit devin fluorescente în momentul bombardării cu electroni.

Preparatul de studiat. În ciuda vitezei lor extrem de mari, electronii sunt foarte repede opriți sau dispersați dacă întâlnesc un preparat biologic a cărui grosime depăşeşte 0,2 μm. De aceea, obiectele mai groase sunt secționate cu ajutorul unui microtom special, pentru a avea o grosime inferioară acestei limite şi supuse unor prelucrări prealabile, menite să asigure mărirea contrastului între diferitele părți ale preparatului. Preparatele biologice neprelucrate au în general un contrast slab, datorită densității foarte apropiate a diferiților constituenți celulari.

Mărimea contrastului imaginii se poate realiza prin mai multe artificii de tehnică şi anume:

- variind tensiunea de accelerare a electronilor (contrastul este mai mare când electronii au viteză mai mică);
- impregnând preparatul cu unele metale grele sau cu sărurile lor, care uneori realizează *colorări* suficient de selective, pentru a juca un rol echivalent coloranților uzuali folosiți în microscopia fotonică;
- depunând un strat subțire de metal prin pulverizare sub o anumită incidență pe suprafața preparatului (umbrire prin metalizare).

Acest ultim procedeu dă informații suplimentare numai asupra reliefului preparatului nu şi asupra structurii sale interne.

În mod obişnuit, secțiunile ultrafine sunt *colorate* în vederea măririi contrastului imaginii electronice, folosind drept *coloranți* uzuali acetatul de

uraniu sau citratul de plumb.

Tehnica colorării negative folosită curent pentru studiul virusurilor, bacteriilor şi al secţiunilor ultrafine are la bază posibilitatea de a înconjura preparatele biologice, cu o substanţă cu greutate atomică mare, în aşa fel încât electronii sunt mai puternic dispersaţi în vecinătatea acestora. În consecinţă, particulele examinate apar în imagine (pe ecranul fluorescent) luminoase pe fond negru. Se foloseşte în mod curent fosfotungstatul de potasiu. Tehnica are numeroase avantaje, fiind simplă, rapid de executat, necesitând substanţe puţine şi uşor accesibile. Preparatele biologice apar în general bine conservate, iar contrastul obţinut este foarte bun. Rezoluţia obţinută prin această tehnică este înaltă, permiţând evidenţierea chiar a unor structuri de 1 nm. Tehnica are dezavantajul că nu poate fi aplicată decât pentru studiul particulelor izolate.

Descoperirea microscopului electronic şi punerea la punct a diferitelor tehnici de îmbunătăţire a imaginilor date de el, a avut un rol deosebit de important în descifrarea organizării moleculare a virusurilor şi stabilirea structurilor fine ale celulelor (Fig. 46).

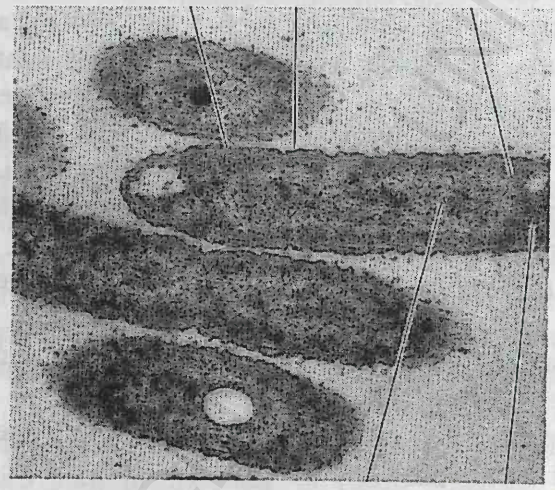


Fig. 46 – Ultrastructura celulei procariote (10000 x, după Alexander, Strete, 2001)

Microscopia electronică are însă o serie de dezavantaje, de care trebuie ţinut seama în interpretarea rezultatelor şi anume:

- nu permite examinarea celulelor vii, în activitate, ci numai după uscare şi fixare, în condiţii de vid înalt, care cel puţin în unele cazuri pot determina alterări morfologice;
- puterea de pătrundere a fasciculului de electroni este mică;
- nu dă indicaţii privind natura chimică a constituenţilor şi structurilor evidenţiate.

De aceea, este necesar ca rezultatele microscopiei electronice să fie corelate cu cele obținute cu ajutorul altor metode (colorații selective, microscopie cu contrast de fază etc).

6.6. MICROSCOPUL ELECTRONIC CU BALEIAJ

După cum am arătat, atât microscopul fotonic cât şi cel electronic convențional (cu transmisie) dau imagini bidimensionale reprezentate de zonele de întuneric şi lumină produse de trecerea luminii sau a electronilor printr-o secțiune fină a preparatului.

Microscopul fotonic prezintă o imagine bidimensională deoarece are o profunzime de câmp foarte limitată, determinată de faptul că radiațiile pot fi focalizate net numai într-un singur plan. Dacă preparatul este foarte transparent, focarul se poate ajusta la diferitele profunzimi, dar imaginea este neclară datorită interacțiunii luminii cu materialul existent în preparat, deasupra şi dedesubtul planului focarului. De aceea, microscopul fotonic permite cel mai bine examinarea unor probe subțiri vizibile cu ajutorul luminii transmise, sau a unor preparate plate, vizibile cu lumina reflectată. El permite evidențierea formei preparatului în profunzime numai cu măriri slabe (sub 200 x).

Microscopul electronic cu transmisie necesită chiar preparate mai subțiri, deoarece câmpul magnetic al lentilelor obiectiv poate focaliza într-o singură imagine plană numai acei electroni care ies din preparat cu aceeaşi energie. De aceea, în cele mai multe cazuri, sunt folosiți în formarea imaginii electronii care au fost deviați dar a căror energie nu a fost modificată. În schimb, electronii care ies din preparat cu un spectru larg de energie, vor fi reflectați (deviați) în cursul trecerii lor prin lentilele magnetice şi imaginea va fi lipsită de claritate. Pentru ca o mare parte din electroni să-şi păstreze energia nealterată, proba de examinat trebuie să fie foarte subțire (nu mai groasă de 50 nm respectiv 1/1000 din diametrul unei celule vii tipice), chiar pentru un fascicul de electroni de 50000-100000 volți.

Trăsătura cea mai importantă a imaginilor oferite de microscopul electronic cu baleiaj este calitatea lor tridimensională cu totul remarcabilă datorită căreia imaginea ochiului unei insecte, a unei hematii, a unui fir de păr sau a unor fotoreceptori prezintă un aspect apropiat de realitate, care lipseşte tuturor tipurilor de imagini obținute cu alte microscoape.

Sub denumirea de baleiaj (fr. *balleyage*, derivat din cuvântul *balayer* – a curăța cu mătura) s-a încetățenit în electronică acțiunea de parcurgere a suprafeței ecranului luminiscent al unui tub catodic, de către un fascicul electronic.

Termenul englezesc *scanning* derivat de la verbul *to scan* – a explora, a examina cu grijă, a analiza atent, succesiv toate părțile unui obiect, are în tehnică un sens similar şi anume acela de a determina parcurgerea unei regiuni anumite în toate părțile sale componente, cu ajutorul unui fascicul controlat.

Microscopul electronic cu baleiaj (MEB) este în esență, un sistem de televiziune cu circuit închis, cu oarecare complexitate de construcție în care preparatul este iluminat de un fascicul punctiform, foarte fin şi mobil de electroni (Fig. 47).

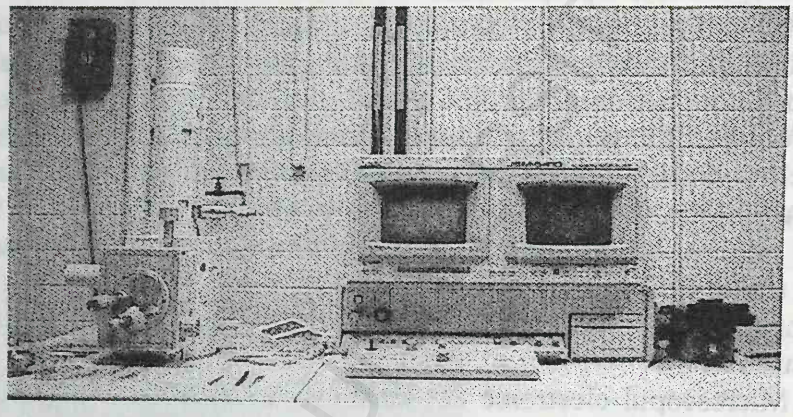


Fig. 47 – Microscopul electronic cu baleiaj

Este demonstrat că atunci când suprafața unui obiect este „măturată" de un fascicul fin de electroni pot fi puse în evidență cu ajutorul electronilor reflectați sau cu ajutorul electronilor secundari emişi de obiect, detaliile de structură ale acestei suprafețe sub forma unei imagini tridimensionale. În felul acesta, microscopul cu baleiaj nu înregistrează electronii care trec prin preparat ci colectează electronii secundari care sunt eliberați de la suprafața obiectului de fasciculul de electroni incident.

Microscopul electronic cu baleiaj adaptat în special pentru examinarea suprafeței obiectelor solide, poate fi folosit şi în biologie, deoarece iradierea cu ajutorul fasciculului de electroni folosit de el, nu este atât de puternică încât să distrugă preparatele biologice.

La microscopul electronic cu baleiaj pot fi examinate diferite preparate biologice: organisme întregi şi nesecționate, celule întregi şi secționate (Fig. 48). Celulele şi țesuturile sunt supuse unei pregătiri prealabile, mult mai simplă şi mai rapid de executat decât pentru microscopia electronică convențională: deshidratare prin criodesicare, dublă fixare cu glutaraldehidă şi tetraoxid de osmiu, deshidratare cu alcool sau

acetonă şi uscare la cald sau mai recent, deshidratare în freon încălzit deasupra punctului critic. Preparatele uscate, montate pe un portobiect sunt acoperite în vid cu un strat subțire de metal (aur, paladiu etc.) care are rolul de a mări producerea de electroni secundari şi de a asigura difuziunea energiei termice şi electrice care au tendința de a se acumula la suprafața preparatului, putând deforma imaginea finală obişnuită.

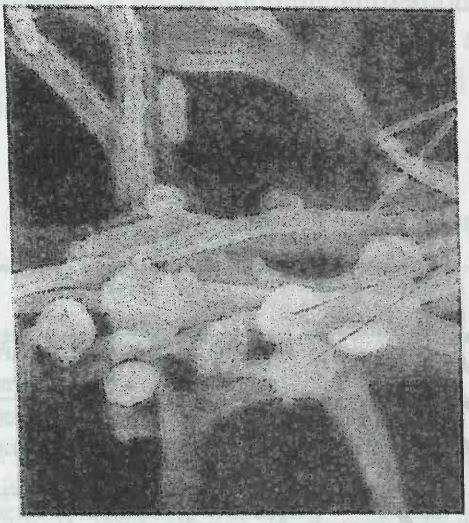


Fig. 48 – Imagine la microscopul cu baleiaj a hifelor şi sporilor unei ciuperci (750 x, după Alexander, Strete, 2001)

Avantajele microscopului electronic cu baleiaj decurg din:

- posibilitatea de a studia obiecte cu grosimi şi dimensiuni relativ mari (până la câțiva cm);
- uşurința şi marea rapiditate cu care se pot pregăti probele de examinat;
- posibilitatea de a observa topografia suprafeței diferitelor obiecte (celule, insecte etc.) fără a mai face copii ale lor, cu o claritate şi o profunzime de fond imposibil de obținut cu oricare altă metodă;
- posibilitatea de a trece foarte uşor de la o imagine în mare a preparatului la o examinare în detaliu printr-un sistem de transfocator, care permite trecerea rapidă, succesiv, spre exemplu, de la o mărire de 200 x la 500 x, 5000 x ş.a.m.d.

Dezavantaje. În afară de prețul de cost ridicat microscopia electronică cu baleiaj are dezavantajul unei puteri relativ mici de mărire final (15-100.000 x) cu mențiunea că dincolo de 20.000 x imaginea devine neclară; are o putere mică de rezoluție (teoretic 10-20 nm, practic chiar mai

mică) în comparație cu microscopia electronică cu transmisie (0,2 – 0,5 nm) ceea ce corespunde unei măriri efective de 1.000.000 x.

Microscopia cu baleiaj nu oferă posibilitatea de studiere a detaliilor celulare.

Utilizată curent în diferite ramuri ale biologiei și patologiei, microscopia electronică cu baleiaj permite o evidențiere directă a unor structuri complexe, completând rezultatele obținute cu a celorlalte tipuri de microscoape, reprezentând în același timp un instrument foarte util pentru învățământ.

În tabelul III sunt prezentate sintetic aplicațiile metodelor de microscopie descrise anterior.

Tabel III – Comparație între tipurile de microscoape

Tipul microscopului	Mărirea	Sursa de iluminare	Aplicații
Microscopul cu fond clar	1- 2000	lumina vizibilă	examinarea diferitelor tipuri de celule colorate sau necolorate
Microscopul cu fond întunecat	1000	lumina vizibilă	observarea celulelor vii necolorate sau colorate și detectarea mobilității
Microscopul cu contrast de fază	10-1500	lumina vizibilă	decelarea și localizarea bacteriilor vii în țesuturi, studierea creșterii și multiplicării, a sporulării, examinarea și observarea structurii celulare
Microscopul cu fluorescență	10-3000	UV	utilizarea substanțelor fluorescente permite evidențierea unor proteine străine, a microorganismelor, virusurilor sau a celulelor în care are loc anticorpogeneza
Microscopul electronic cu transmisie (MET)	200-1000000	electroni	examinarea și studiul ultrastructurii celulelor și virusurilor
Microscopul electronic cu baleiaj (MEB)	200-500000	electroni	examinarea și studiul suprafețelor celulare și a materialelor non-biologice, imaginile sunt prezentate în formă tridimensională.
Microscopul sistemic	combinație a MET și MEB	electroni	aplicații similare celor citate la MET și MEB.

7. MORFOLOGIA ŞI DIMENSIUNILE BACTERIILOR

7.1. MORFOLOGIA BACTERIILOR

Forma şi dimensiunile bacteriilor sunt elemente importante pentru diferenţierea şi clasificarea lor. Morfologia tipică a bacteriilor este dată de aspectul pe care îl prezintă celulele tinere, active din punct de vedere fiziologic, în condiţii favorabile de mediu.

În general, la bacterii se disting 5 tipuri morfologice fundamentale:

- rotund (cocoid);
- alungit - cilindric (bacilar);
- spiralat (elicoidal);
- filamentos;
- pătrat.

TIPUL COCOID

Acest tip morfologic cuprinde bacteriile numite generic coci (Fig. 49). Cocii sunt sferici, elipsoidali sau neregulaţi, cu diametrele celulei aproximativ egale.

Celulele sunt sferice la *Staphylococcus aureus* atunci când sunt izolate sau ovale, turtite pe o latură, atunci când sunt grupate. Au diametrul cuprins între 0,8-1 μm, cu variaţii în cadrul speciei.

În frotiu stafilococii prezintă o dispoziţie caracteristică în grămezi neregulate sau ciorchine. Această dispoziţie se observă mai ales în cazul culturilor dezvoltate pe mediu solid (geloză). În medii lichide (bulion) se dezvoltă în lanţuri scurte sau grupări în diplo. Sunt bacterii nesporulate, necapsulate, imobile şi Gram-pozitive. Temperatura optimă de dezvoltare este 37^0 C, pH-ul optim 7,2-7,6.

Stafilococii cresc cu uşurinţă pe medii obişnuite de cultură. În bulion, după incubare timp de 24 ore la 37^0 C, tulbură uniform mediul, formând un depozit moderat pe fundul tubului. Pe geloză dezvoltă colonii rotunde de 1-2 mm diametru, opace, cu suprafaţa convexă, netedă sau uşor granulată, cu margini neregulate, de consistenţă moale, uşor detaşabile de mediu. Coloniile foarte tinere sunt totdeauna incolore, ulterior ele pigmentându-se, prezenţa pigmentului a permis diferenţierea celor trei variante de stafilococi: "aureus", "citreus", "albus".

Staphylococcus aureus (Fig. 50) este o bacterie saprofită cu o largă răspândire în mediul înconjurător, în aer, praf şi pe obiecte de uz zilnic. Se

întâlneşte pe piele, mucoase şi în cavităţile naturale ale omului şi animalelor.

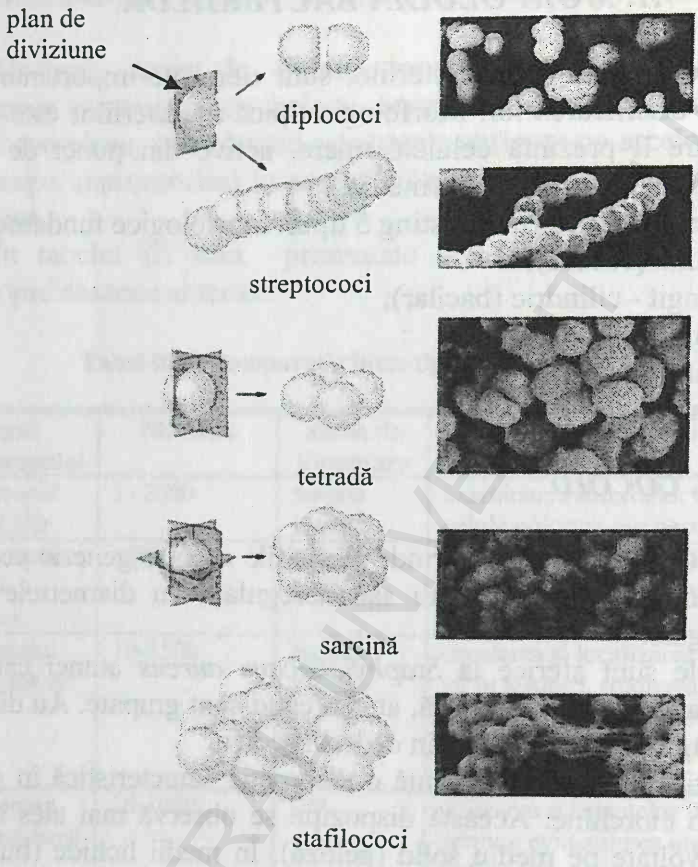


Fig. 49 – Morfologia bacteriilor – tipul cocoid (după Tortora, Funke, Case, 2002)

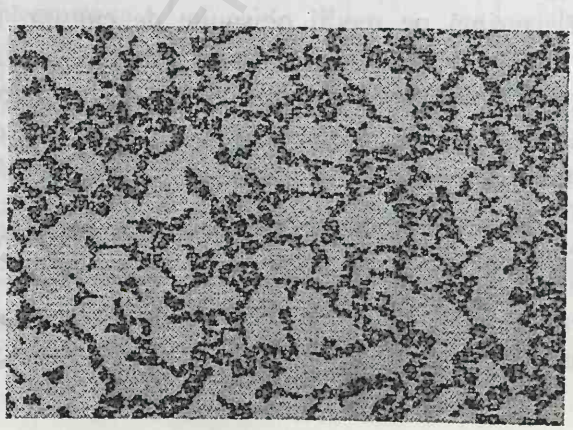


Fig. 50 – *Staphylococcus aureus* (3600 x)

Pe lângă formele comensale, stafilococii prezintă şi forme patogene, capabile să producă variate procese infecţioase. La nivelul pielii produce cele mai variate manifestări, de la pustule simple, la abcese şi furuncule.

În etiologia cistitelor şi pielo-nefritelor, stafilococii ocupă locul al doilea după *Escherichia coli*. De asemenea, stafilococii sunt frecvent semnalaţi în asociaţii cu alţi germeni patogeni în infecţiile veziculei biliare şi ale apendicelui.

La nivelul căilor aeriene pot produce diferite angine, infecţii bronşice, infecţii pulmonare care la copii mici evoluează ca bronhopneumonii, adesea fatale.

Ingerarea unor alimente contaminate cu stafilococi enterotoxici poate provoca fenomenul de toxiinfecţii alimentare.

O entitate patologică distinctă o constituie enterita stafilococică postantibiotică, boală ce poate apărea la bolnavii trataţi cu substanţe antibiotice pe cale orală sau parenterală.

Celulele de formă elipsoidală sunt întâlnite la genul ***Streptococcus*** *(Streptococcus pyogenes)*. Celulele au diametrul de 0,8-1 μm şi sunt dipuse în diplo sau în lanţuri de lungimi variabile, funcţie de specie, tulpină şi de condiţiile de cultivare. Streptococii sunt imobili (cu excepţia unor tulpini de enterococi), nesporulaţi, necapsulaţi. Unele specii de enterococi (streptococii intestinali) posedă capsule de natură polizaharidică. Streptococii sunt Gram pozitivi. Temperatura optimă de dezvoltare este 37^0 C, pH-ul optim 7,4-7,6. Streptococii sunt aerobi, anaerobi şi microaerofili.

Genul *Streptococcus* (Fig. 51) cuprinde bacterii larg răspândite în natură. Există specii cu proprietăţi foarte diferite. Unele specii trăiesc saprofite în lapte şi produsele lactate, fiind total nepatogene.

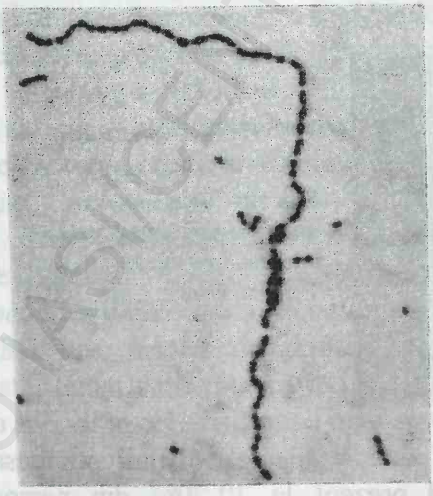


Fig. 51 – *Streptococcus* sp. (2500 x)

Altele sunt comensale, populând mucoasele nazo-faringiană, bucală, intestinală sau genitală la om şi animale. O serie de specii sunt patogene pentru om şi animale. La om streptococii patogeni provoacă infecţii cu localizări variate: angina, scarlatina, erizipelul, flegmoane etc.

Infecţiile streptococice ale pielii prezintă o mare diversitate de forme clinice. Un exemplu îl constituie erizipelul - inflamaţie streptococică a dermului cu multiplicarea germenilor în spaţiile limfatice.

Infecţiile cu streptococi ale plăgilor cutanate (arsuri, plăgi chirurgicale) pot duce la celulite, flegmoane etc.

Căile respiratorii superioare pot fi sediul a numeroase infecţii cu streptococi: nazofaringite, amigdalite, scarlatina, sinuzite, otite. Laringita, traheobronşita, bronhopneumonia, pleurezia fac parte dintre manifestările streptococice ale tractului respirator inferior.

Angina streptococică evoluează mai ales în timpul epidemiilor de scarlatină şi paralel cu ele se distinge de această boală prin faptul că indivizii afectaţi, posedând o imunitate antitoxică, nu prezintă erupţii.

Scarlatina este o boală acută, contagioasă, caracterizată prin angină, febră şi fenomene toxice de diferite grade, mergând până la formele hipertoxice. Complicaţiile ca otita, nefrita, se pot termina cu septicemie.

Infecţiile streptococice ale tubului digestiv de tipul gastrită, enterocolită flegmonoasă, apendicită, colecistită, peritonită sunt provocate de specii de enterococi şi streptococi nehemolitici care sunt totodată şi agenţi etiologici ai infecţiilor urinare ca: pielită, pielo-nefrită, cistită.

La ***Streptococcus pneumoniae*** (Fig. 52), cocii au formă ovalară, lanceolată (flacără de lumânare) cu capetele bombate. Celulele au diametrul de 0,5-1,25 μm, cu aşezare tipică în diplo. Pneumococul este o bacterie nesporulată, necapsulată (tulpinile patogene sunt capsulate), imobilă şi Gram pozitivă.

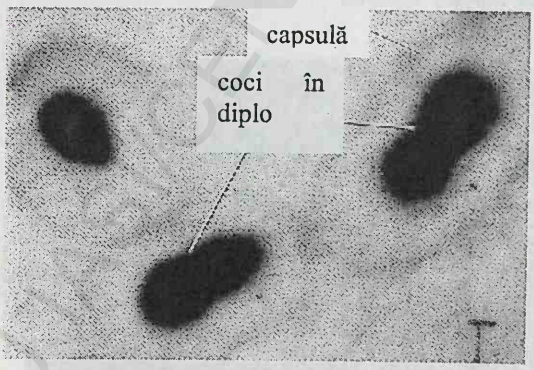


Fig. 52 – *Streptococcus pneumoniae* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case, 2002)

Streptococcus pneumoniae este o specie obişnuit comensală a căilor respiratorii superioare, fiind prezent la 30-70% din persoanele

sănătoase. Nu se găseşte liber în natură din cauza sensibilităţii sale la condiţiile de mediu. Temperatura optimă de dezvoltare este 37^0 C, pH-ul optim 7,6-7,8. Pneumococii sunt aerobi şi facultativ anaerobi. Este principalul agent etiologic al pneumoniei lobare acute şi al bronhopneumoniei, afecţiuni în care este întâlnit în 90 % din cazuri.

De asemenea, cocii pot fi reniformi, formă întâlnită la genul ***Neisseria*** (*Neisseria meningitidis, Neisseria gonorrhoeae* – Fig. 53). În frotiuri, aceste bacterii au aspect de coci asimetrici, grupaţi câte doi, cu feţele adiacente uşor concave, sugerând imaginea "boabelor de cafea", intracelulari (uneori extracelulari), înglobaţi în leucocitele polimorfonucleare, cu dimensiuni uniforme (0,6-1 μm). Sunt nesporulate, uneori prezintă capsulă şi fimbrii, Gram-negative. Sunt aerobe şi facultativ anaerobe. Temperatura optimă de dezvoltare 37^0 C, pH-ul optim 7-7,2.

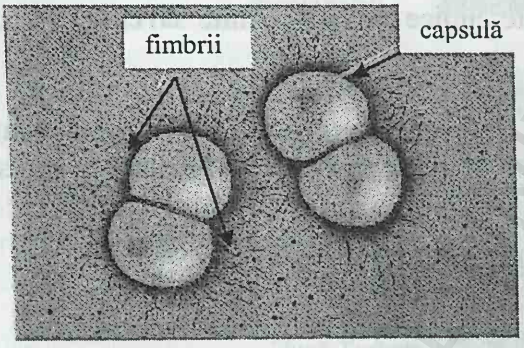


Fig. 53 – *Neisseria gonorrhoeae* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case, 2002)

Strict patogene, adaptate la specia umană, speciile *Neisseria meningitidis* şi *Neisseria gonorrhoeae* nu au fost observate la animale.

Neisseria meningitidis (meningococul) este agentul cauzal al meningitei cerebro-spinale (epidemice), iar *Neisseria gonorrhoeae* (gonococul) este agentul etiologic al bolii venerice numită gonoree.

Unul din criteriile de identificare şi clasificare al cocilor îl constituie modul de grupare al celulelor după diviziune, determinat de planurile după care se face diviziunea şi tendinţa celulelor surori de a rămâne unite unele de altele.

Când diviziunea se face după un singur plan, iar celulele rămân izolate, acestea poartă numele de **micrococi** (*Micrococcus ureae*). ***Micrococcus ureae*** este o bacterie care prezintă celule sferice, cu diametrul de 0,8-1 μm, dispuse în diplo sau grămezi, necapsulate, nesporulate, neciliate, Gram-variabile. Este o bacterie aerobă şi saprofită, cantonată în sol, în special în cel îngrăşat cu îngrăşăminte organice (uree).

Dacă celulele rezultate în urma diviziunii rămân ataşate câte două, în perechi, formează **diplococi** (*Streptococcus pneumoniae, Neisseria meningitidis* şi *Neisseria gonorrhoeae*).

Dacă tendiţa de ataşare a celulelor este mai pronunţată se formează lanţuri mai lungi sau mai scurte de coci, constituind forma de **streptococ** (*Streptococcus pyogenes*).

În urma unei diviziuni după două planuri perpendiculare între ele, celulele surori rămân ataşate câte patru, formând **tetrade** (*Gafkia tetragena*).

Gafkia tetragena (tetragenul) prezintă celule în formă de coc, adesea încapsulate, cu o dispoziţie caracteristică în tetrade. În general, lipsit de patogenitate este întâlnit ca saprofit în căile aeriene superioare. Ca germene de asociaţie poate fi observat în diferite afecţiuni respiratorii.

Diviziunea cocilor poate avea loc după trei planuri perpendiculare unul pe celălalt, rezultând pachete cubice de coci numite **sarcine** (*Sarcina lutea*).

Sarcina lutea (Fig. 54) prezintă celule de formă sferică, cu dispoziţia caracteristică genului, în pachete cubice, imobile, nesporulate, necapsulate, Gram pozitive. Este o bacterie saprofită, răspândită în aer, sol şi apă.

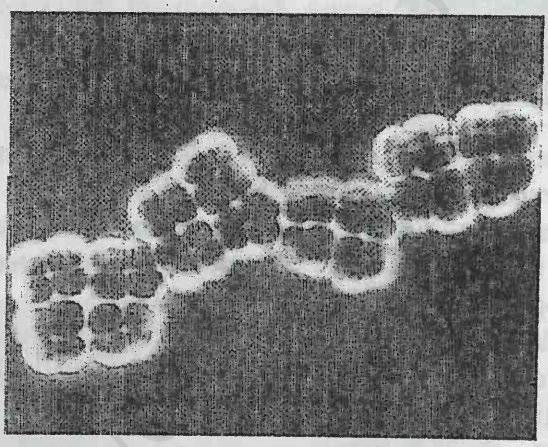


Fig. 54 – *Sarcina lutea* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case, 2002)

Atunci când diviziunea se face după mai multe planuri neregulate, celulele se dispun sub formă de ciorchine, alcătuind **stafilococul** (*Staphylococcus aureus*).

TIPUL BACILAR

Din acest tip morfologic fac parte bacteriile cilindrice, sub formă de bastonaşe, cu diametrul longitudinal de câteva ori mai mare decât cel

transversal (Fig. 55). Forma bacililor prezintă unele variaţii care se referă la marginile şi extremităţile celulelor.

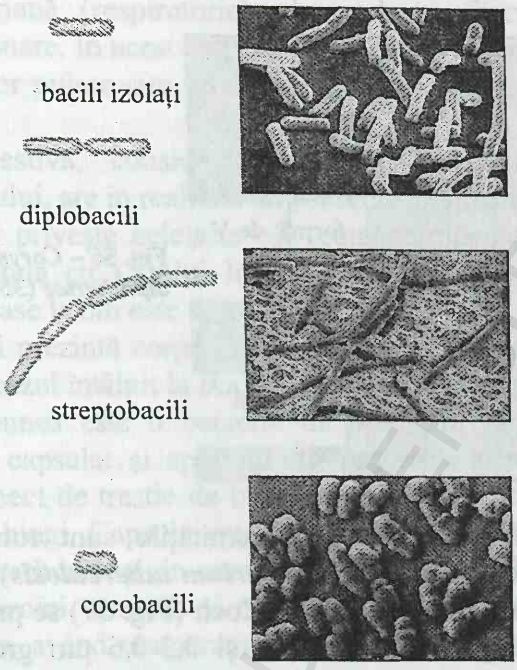


Fig. 55 – Morfologia bacteriilor – tipul bacilar
(după Tortora, Funke, Case, 2002)

Marginile pot fi paralele sau sunt îndepărtate la una sau ambele extremităţi, dând aspectul de măciucă sau halteră aşa cum întâlnim la ***Corynebacterium diphtheriae*** (bacilul difteric – Fig. 56). Lungimea corpului acestei bacterii variază între 2-8 μm şi lăţimea între 0,5-1 μm. Este drept sau uşor curbat. Se aşază mai rar în palisade, obişnuit formează unghiuri între ei, desenând litere din alfabet (L, M, N, V, etc.). Este Gram-pozitiv la limită, adică decolorarea mai insistentă face să piardă culoarea violet, devenind mov sau roz; este nesporulat, necapsulat şi imobil.

Corynebacterium diphtheriae (bacilul difteric) este un germene aerob şi microaerofil. Temperatura optimă de dezvoltare este 36-37^0 C, iar pH-ul optim 7,8-8,2. Este agentul cauzal al amigdalitei, anginei difterice, laringitei şi rinitei difterice, fiind tipul clasic de bacterie care rămâne la poarta de intrare în organism unde secretă toxina difterică difuzibilă. Această toxină se răspândeşte în organism pe cale limfatică, sangvină sau nervoasă, având afinitate pentru anumite ţesuturi (miocard, glande suprarenale, rinichi, musculatură netedă, sistem nervos) determinând, pe de

o parte, degenerescenţe parenchimatoase grave (miocardite), iar pe de altă parte, polinevrita difterică şi paraliziile postdifterice care intersectează diferiţi nervi cranieni (în special nervul oculomotor).

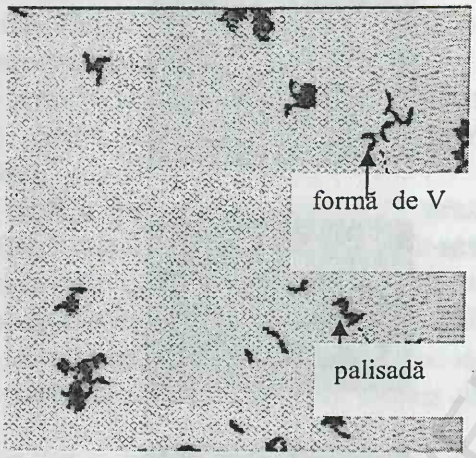


Fig. 56 – *Corynebacterium diphtheriae* (3500 x)

La majoritatea bacililor, extremităţile sunt rotunjite, marginile paralele, corpul uşor curbat (***Mycobacterium tuberculosis***).

Bacilul tuberculos sau bacilul Koch (Fig. 57) se prezintă sub formă de bastonaş cu lungimea de 1-4 μm şi 0,3-0,6 μm grosime, de formă neregulată, uneori ramificat.

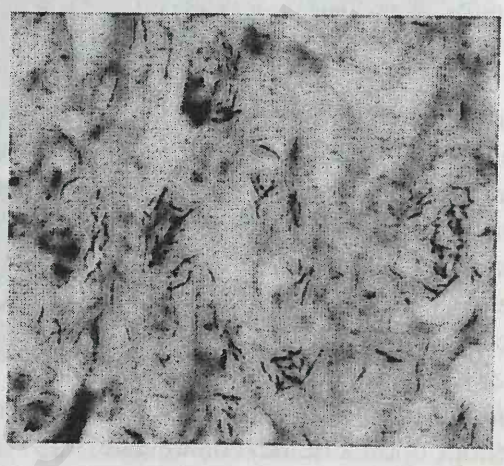


Fig. 57– *Mycobacterium tuberculosis* (după Wistreich, 1999)

Poate apărea şi izolat, adesea reunit în grămezi mici, în care corpii microbieni formează figuri în formă de litere din alfabet: L, X, V. Este imobil, nesporulat, necapsulat, alcoolo-acidorezistent. *Mycobacterium tuberculosis* este un parazit obligatoriu, de aceea nu trăieşte liber în natură, în afara gazdelor pe care le parazitează. Din această cauză la om,

contaminarea este aproape întotdeauna interumană. Este agentul etiologic al tuberculozei.

Calea de acces a bacililor în organism este, în marea majoritate a cazurilor, cea aeriană (respiratorie), de unde şi frecvenţa ridicată a localizărilor pulmonare. În acest caz, bacilii ajunşi în parenchime determină la nivelul alveolelor pulmonare procesul inflamator caracteristic leziunilor tuberculoase.

Calea digestivă, considerată de unii ca principala cale de contaminare a omului, are în realitate un rol redus în infectarea naturală.

În ceea ce priveşte celelalte căi (cutaneo-mucoasă, conjunctivală, amigdaliană, genitală etc.), rolul lor în diseminarea pe cale naturală a infecţiei tuberculoase la om este foarte redus.

Unii bacili prezintă corpul rectiliniu, marginile paralele şi capetele tăiate drept. Este cazul întâlnit la *Bacillus anthracis* (bacilul cărbunos – Fig. 58). Bacilul cărbunos este o bacterie de 5-10 μm lungime şi 1-3 μm grosime, imobil, capsulat şi sporulat. În procesele patologice formează lanţuri scurte (aspect de trestie de bambus) şi nu prezintă spori. În culturi formează lanţuri lungi. Capsula este sintetizată numai în mediu bogat în albumine sau bicarbonat şi în atmosferă de CO_2 (20%). În aerobioză, formează spori ovoizi, centrali şi nedeformanţi. Este un germene aerob, facultativ anaerob, având temperatura optimă de dezvoltare 35-38^0 C, iar pH-ul=7-7,4.

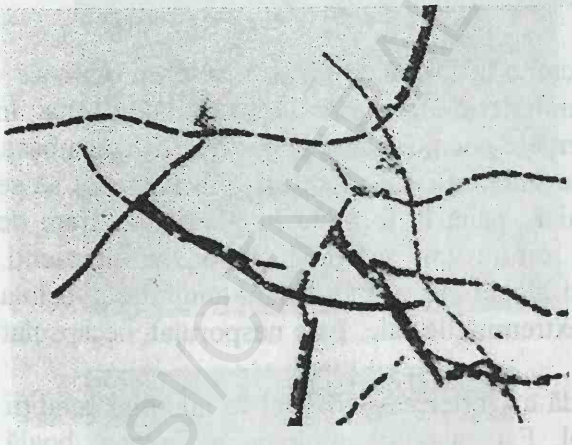


Fig. 58 – *Bacillus anthracis* (3600 x, după Alexander, Strete, 2001)

Bacillus anthracis este o bacterie patogenă, întâlnită mai ales în solul de păşune. Este agentul patogen al bolii numite antrax, dalac sau cărbune, boală întâlnită la animalele ierbivore şi la om. Infecţia cărbunoasă este o boală de păşune care se întâlneşte mai ales la ierbivore (oi, vite, cai) şi care produce infecţii intestinale frecvente ca rezultat al ingerării sporilor.

O păşune infectată cu sporii acestei specii poate constitui sursă de infecţii timp de 20-30 ani.

La om, cel mai frecvent apare antraxul cutanat, cu o frecvenţă mai mică forma pulmonară şi foarte rar cea digestivă.

Antraxul cutanat apare în special la oamenii care lucrează direct cu vitele sau în industriile prelucrătoare ale produselor obţinute de la aceste animale (piei, lână), manifestându-se sub forma unor pustule care prezintă în regiunea centrală o necroză crateriformă albastră-roşie-negricioasă şi care treptat devine de culoare neagră şi foarte dureroasă.

Antraxul pulmonar apare prin inhalarea sporilor mai ales la muncitorii care prelucrează lâna, pielea, blana animalelor infectate. Boala, sub această formă, este în majoritatea cazurilor mortală.

Antraxul intestinal, rar la om, apare în urma ingerării de carne infectată care a fost insuficient preparată termic (friptă sau fiartă).

Bacilii pot fi grupaţi în diplo - diplobacili sau lanţuri - streptobacili. Unii se dispun sub formă de palisadă ori pachete de ace cu gămălie (*C. diphtheriae*), iar alţii formează grupări caracteristice de rozetă sau stea (*Agrobacterium stellatum*).

1. TIPUL SPIRALAT (elicoidal)

Cuprinde bacterii cilindrice, alungite, dar care prezintă curburi ale axului longitudinal. Se deosebesc 3 subtipuri (Fig. 59):

a) Vibrionul este o bacterie în formă de virgulă (***Vibrio cholerae*** – Fig. 60). Morfologia vibrionului holeric este variabilă, funcţie de habitat. În intestin se pot întâlni de la formele cocoide până la formele filamentoase, ceea ce îi face deseori greu de indentificat. În culturi, vibrionii pot să se înfăţişeze de la formele granulare până la formele lungi. Este extrem de mobil, poate cel mai mobil dintre toţi germenii patogeni cunoscuţi. Mobilitatea este datorată unui flagel de 2-3 ori mai lung decât celula propriu-zisă, situat la una din extremităţile sale. Este nesporulat, necapsulat şi Gram-negativ.

Omul este singura gazdă a vibrionului holeric. În anumite condiţii poate fi întâlnit în apă şi sol. Este agentul etiologic al holerei, boală originară din Asia, cu o putere foarte mare de răspândire, transmisibilă prin contact direct, prin apă şi alimente poluate cu fecalele persoanelor bolnave.

b) Spirilul este o bacterie în formă de spirală rigidă (*Spirillum volutans* – Fig. 61).

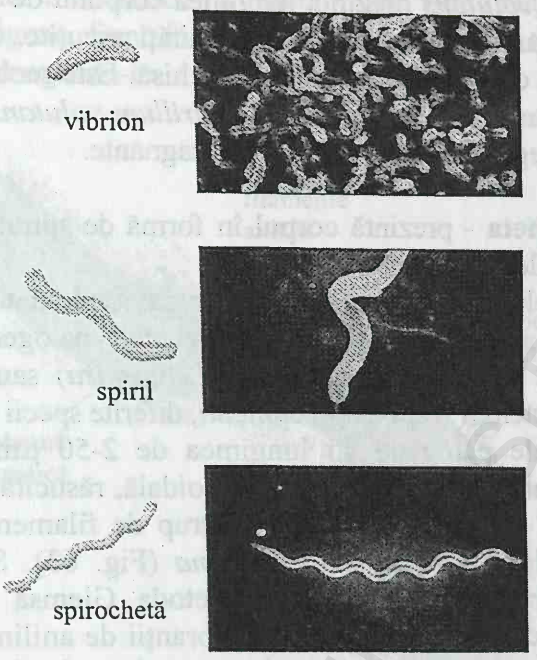


Fig. 59 – Morfologia bacteriilor – tipul spiralat (după Tortora, Funke, Case, 2002)

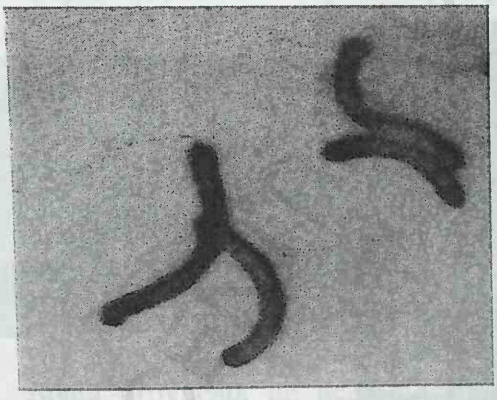


Fig. 60 – *Vibrio cholerae* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case, 2002)

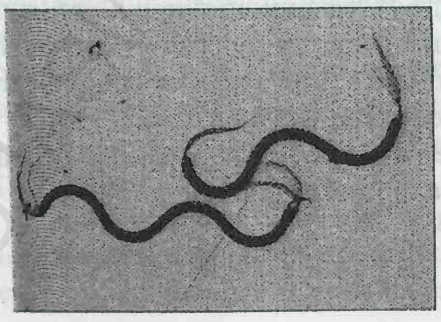


Fig. 61 – *Spirillum volutans* **(3600 x)**

Spirillum volutans prezintă lungimea corpului de 14-60 μm, cu un diametru de 1,5 μm, având ambele extremităţi ascuţite. În citoplasmă se observă granulele de volutină de culoare închisă. Este mobil, prezentând la fiecare pol câte un smoc de 15 flageli. *Spirillum volutans* este o bacterie saprofită, Gram negativă, întâlnită în apele stagnante.

c) Spirocheta - prezintă corpul în formă de spirală, cu mai multe ture de spiră, dar flexibile.

Spirochetele saprofite se întâlnesc în cavităţile naturale ale omului şi animalelor, în apă şi solul umed. Spirochetele patogene se găsesc în organismul uman (*Treponema, Borrelia, Leptospira*) sau în organismul animalelor şi insectelor (*Treponema cuniculi*, diferite specii de *Borrelia*).

Spirochetele patogene au lungimea de 2-50 μm. Protoplasma, învelită de o membrană celulară, este helicoidală, răsucită pe un filament axial (*Leptospira* – Fig. 62), sau pe un grup de filamente axiale ca la specii ale genurilor *Borrelia* şi *Treponema* (Fig. 63). Spirochetele se colorează atât prin metode speciale (metoda Giemsa şi impregnare argentică), cât şi cu soluţii apoase din coloranţii de anilină. În preparate proaspete, spirochetele, vizibile la microscopul cu fond întunecat, sunt mobile, prezentând mişcări de rotaţie, flexie şi translaţie.

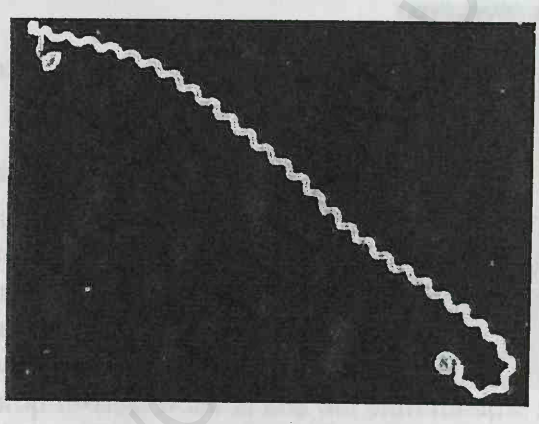


Fig. 62 – *Leptospira interogans* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case 2002)

Treponema pallidum (Fig. 64), agentul etiologic al sifilisului, se localizează la nivelul organismului infectat în şancrul primar, în fasciile conjunctive, cicatrici, ganglioni limfatici, tunica vaselor cerebrale, aortei, placentă etc. Poate invada organele interne fără a provoca leziuni.

Treponemele au o lungime de 1-1,5 μm, în preparatele proaspete prezentând mişcări active de rotaţie în jurul axului longitudinal.

Caracterele biochimice şi metabolice sunt puţin cunoscute la treponemele patogene. Sunt foarte sensibile la căldură, temperaturile mai mari de 41^0 C distrugându-le.

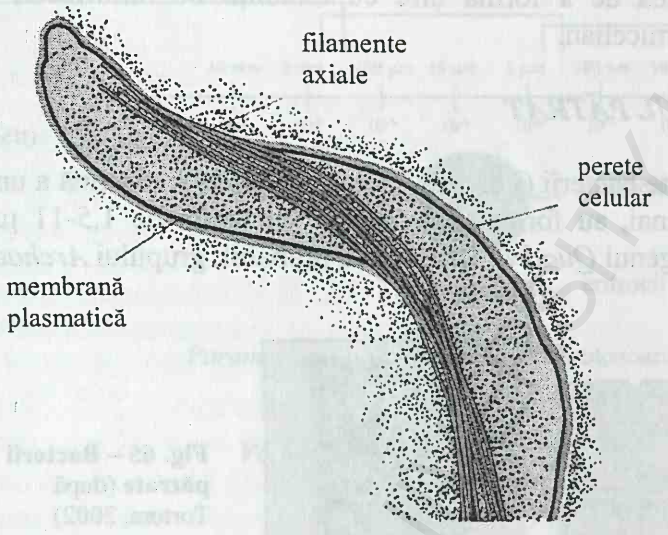


Fig. 63 – *Treponema pallidum* – dispunerea protoplasmei în jurul filamentelor axiale

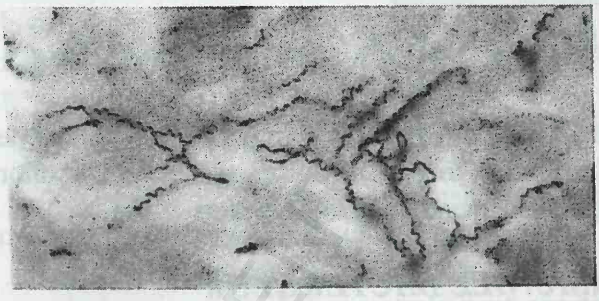


Fig. 64 – *Treponema pallidum* (imagine la microscopul electronic, după Tortora, Funke, Case, 2002)

Boala provocată de această specie – sifilisul – este o boală venerică, agentul patogen trecând de la persoana infectată la cea sănătoasă prin contact sexual şi mai puţin (0,01 % din cazuri) prin convieţuire – utilizarea lenjeriei, tacâmurilor, toaletei comune sau prin infectarea profesională. Majoritatea deceselor se datorează leziunilor cardio-vasculare şi ale sistemului nervos provocate în ultimul stadiu de evoluţie al bolii – sifilisul terţiar.

În afară de aceste tipuri morfologice fundamentale, există şi un tip morfologic intermediar între tipul cocoid şi bacilar, numit ***tip cocobacilar***. La acesta, cele două diametre ale celulei se apropie de unitate.

TIPUL FILAMENTOS

Aceste bacterii au ca prototip actinomicetele, microorganisme procariote cu asemănări morfologice izbitoare cu fungii, având particularitatea de a forma hife cu tendințe de ramificare, de unde şi aspectul lor micelian.

TIPUL PĂTRAT

Aceste bacterii (Fig. 65), izolate din apa hipersalină a unor bălți din Peninsula Sinai, au forma unor pătrate cu latura de 1,5-11 μm. Au fost încadrate în genul *Quadra*, aparținând, probabil, grupului *Archaeobacteria.*

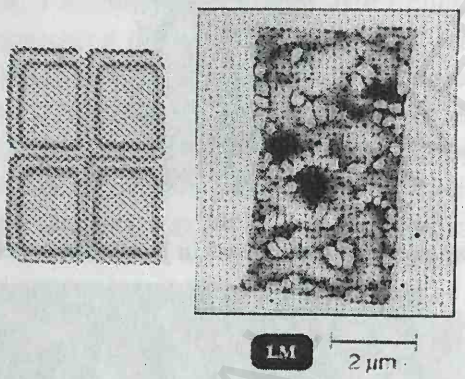


Fig. 65 – Bacterii pătrate (după Tortora, 2002)

În afara acestor 5 tipuri morfologice de bază există bacterii cu forme particulare, determinate de gruparea lor într-un trichom, prezența unor prelungiri celulare (prosteca), a unor apendice acelulare etc.

7.2. DIMENSIUNILE BACTERIILOR

În general, dimensiunile bacteriilor sunt de ordinul micrometrilor, din care cauză nu pot fi observate cu ochiul liber (Fig. 66).

Dimensiunile cocilor variază între 0,2-2 μm.

Dimensiunile bacililor variază între 0,3-2 μm (diametrul transversal) şi 0,5-10 μm (diametrul longitudinal). Dimensiunile spirililor şi spirochetelor variază între 0,25-3,5 μm diametrul transversal şi 6-100 μm diametrul longitudinal.

În culturile vechi, sub acțiunea nefavorabilă a agenților fizici, chimici şi biologici, dimensiunile bacteriilor pot creşte foarte mult

obținându-se forme filamentoase, lungi de peste 100 μm sau forme globuloase cu diametrul de 5-10 μm.

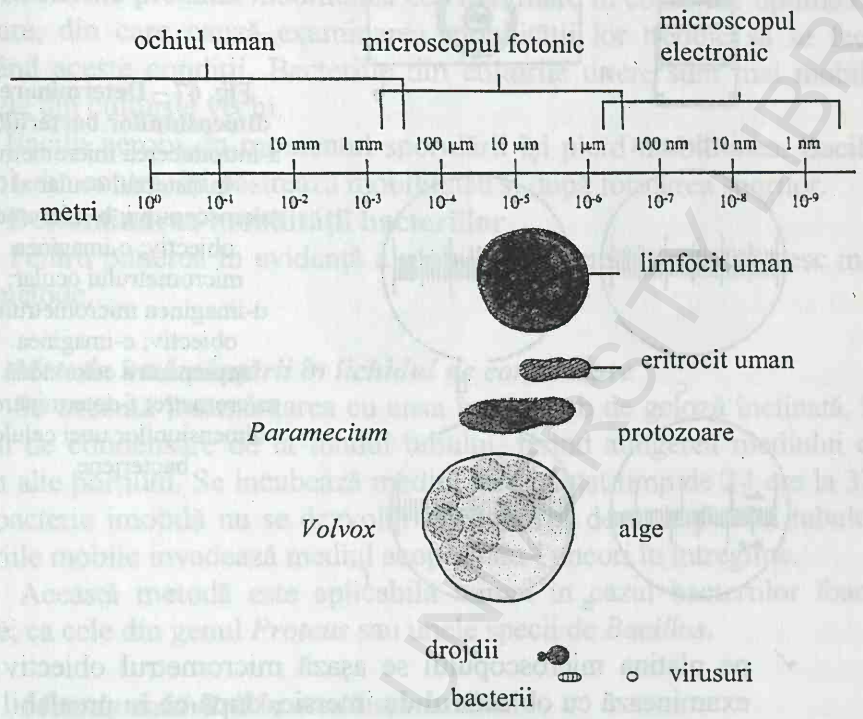


Fig. 66 – Dimensiunile comparative ale virusurilor, celulelor procariote şi eucariote

Determinarea dimensiunilor bacteriilor

Pentru determinarea dimensiunilor bacteriilor se foloseşte metoda măsurării cu micrometrul ocular (Fig. 67).

Această metodă se recomandă în cazurile când sunt necesare aprecieri mai exacte. Micrometrele sunt constituite din discuri de sticlă pe care sunt gravate scări gradate. Pentru determinare sunt necesare întotdeauna două micrometre:

- ✓ un micrometru obiectiv;
- ✓ un micrometru ocular.

Tehnica de lucru:

- ✓ se deşurubează lentila superioară a sistemului ocular şi se introduce micrometrul ocular cu faţa gravată în jos, apoi lentila superioară a ocularului se înşurubează la loc;

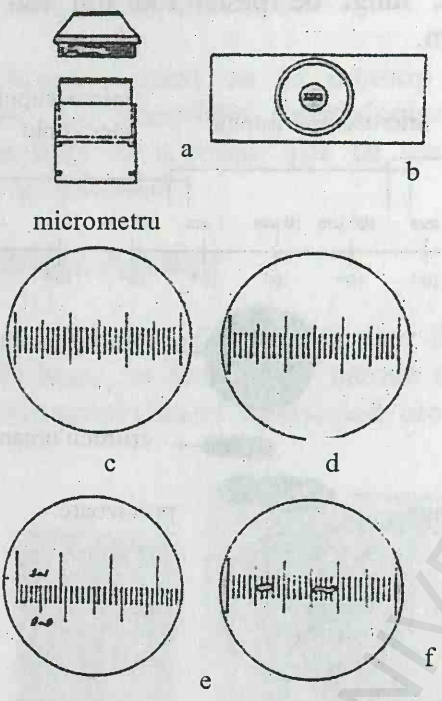


Fig. 67 – Determinarea dimensiunilor bacteriilor: a-introducerea micrometrului în sistemul ocular al microscopului; b-micrometru obiectiv; c-imaginea micrometrului ocular; d-imaginea micrometrului obiectiv; e-imaginea suprapusă a celor două micrometre; f-determinarea dimensiunilor unei celule bacteriene.

- ✓ pe platina microscopului se aşază micrometrul obiectiv şi se examinează cu obiectivul de imersie, după ce în prealabil scara micrometrului a fost centrată cu un obiectiv uscat; este bine să se lucreze cu microscoape al căror tub are lungimea = 160 mm, iar în cazul microscoapelor cu lungimea tubului reglabil se recomandă ca acesta să se regleze tot la 160 mm;
- ✓ micrometrul obiectiv se reglează astfel încât liniile zero ale celor două scări gradate să se suprapună; apoi se observă şi se notează care din diviziunile celor două micrometre se suprapun; valorile găsite la micrometrul obiectiv se înmulţesc cu 10 (valoarea în μm a unei diviziuni) şi se împart apoi la valorile corespunzătoare de pe scara micrometrului ocular; cifra obţinută reprezintă valoarea micrometrică a unei diviziuni din scara gradată a micrometrului ocular.

7.3. MOBILITATEA BACTERIILOR

Mobilitatea bacteriilor se datorează flagelilor care reprezintă organitele de mişcare ale acestora. Datorită lor, o bacterie poate parcurge într-o secundă o distanţă de 10-12 ori mai mare decât lungimea ei. Knayal

consideră că aceste viteze pot fi depăşite de unele specii care se deplasează chiar cu 0,2 mm/sec.

Bacteriile prezintă mobilitatea cea mai mare în condiţiile optime de dezvoltare, din care cauză examinarea mobilităţii lor trebuie să se facă respectând aceste condiţii. Bacteriile din culturile tinere sunt mai mobile decât cele din culturile vechi.

Bacilii aerobi, în momentul sporulării îşi pierd mobilitatea. Bacilii anaerobi, din contra, îşi păstrează mobilitatea şi după formarea sporilor.

Determinarea mobilităţii bacteriilor

Pentru punerea în evidenţă a mobilităţii bacteriilor se folosesc mai multe metode.

Metoda însămânţării în lichidul de condensare

Se execută însămânţarea cu ansa într-un tub de geloză înclinată, în lichidul de condensare de la fundul tubului, ferind atingerea mediului cu ansa în alte porţiuni. Se incubează mediul însămânţat timp de 24 ore la 37^0 C. O bacterie imobilă nu se dezvoltă în acest caz decât la fundul tubului. Bacteriile mobile invadează mediul acoperindu-l uneori în întregime.

Această metodă este aplicabilă numai în cazul bacteriilor foarte mobile, ca cele din genul *Proteus* sau unele specii de *Bacillus*.

Metoda cultivării în medii semisolide

Dacă se însămânţează prin înţepare o bacterie imobilă în agar moale, ea se dezvoltă numai de-a lungul liniei parcurse de ansă, restul mediului rămânând limpede. În aceleaşi condiţii de lucru, o bacterie mobilă invadează întreaga masă a mediului, opacifiindu-l uniform.

Metoda tubului în U (după Vahlne) sau metoda transmigraţiei

Se confecţionează tuburi de sticlă în formă de U din sticlă fuzibilă cu diametrul de 5-6 mm. Lungimea unei ramuri trebuie să fie de aproximativ 8-10 cm. În aceste tuburi se repartizează un mediu de cultură (agar nutritiv 0,2-0,4%). Mediul ajunge în ambele ramuri ale tubului la jumătatea înălţimii acestora. Ambele extremităţi se astupă cu dopuri de vată, după care se autoclavează. După solidificarea mediului, într-una din ramurile tubului se însămânţează prin înţepare tulpina bacteriană de examinat. Tuburile însămânţate se incubează la termostat la 37^0 C, urmărindu-se din timp în timp. Speciile bacteriene imobile se dezvoltă numai în ramura în care s-a făcut însămânţarea de-a lungul liniei de însămânţare, în timp ce bacteriile mobile difuzează în toată masa mediului, producând o turbiditate a acestuia, invadându-l până la suprafaţa ramurii opuse (Fig. 68).

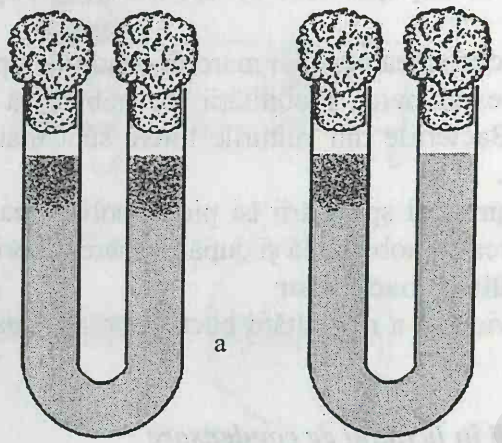


Fig. 68 – Examenul mobilității bacteriilor prin folosirea tuburilor în formă de U: a) bacterie mobilă; b) bacterie imobilă.

În afara acestor metode directe de punere în evidență a mobilității există şi alte metode prezentate în Capitolul 5.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. IDENTIFICAREA UNEI BACTERII NECUNOSCUTE

Una dintre cele mai interesante experienţe în microbiologie este identificarea unui microorganism necunoscut.

Primul pas în procedura de identificare este acumularea de informaţii privind caracteristicile morfologice, de cultură, fiziologice şi biochimice ale microorganismului necunoscut. Aceasta implică realizarea şi colorarea frotiurilor necesare studiului caracterelor morfologice ale bacteriilor, însămânţarea pe diferite medii de cultură pentru observarea caracterelor de cultură a acestora, precum şi evidenţierea echipamentului lor enzimatic, diferit de la o specie la alta, prin aşa numitele "reacţii sau teste biochimice".

Punerea în evidenţă a enzimelor bacteriene prin teste biochimice se realizează prin două categorii de metode mai importante:

A. Metode prin care se urmăreşte în mod direct acţiunea bacteriei asupra unui substrat. În acest caz, se observă însăşi modificarea fizică sau chimică a substratului (ex. lichefierea gelatinei, lichefierea serului coagulat etc.).

B. Metode prin care nu poate fi observată în mod direct modificarea substratului, dar prin care se pot pune în evidenţă, cu ajutorul diferiţilor reactivi, metaboliţii rezultaţi din scindarea substratului în urma acţiunii enzimelor bacteriene (ex. triptofanaza nu se pune în evidenţă printr-o modificare vizibilă a triptofanului din mediu, ci prin punerea în evidenţă a indolului, metabolit rezultat din descompunerea triptofanului).

Odată obţinute, informaţiile sunt strânse şi notate într-o anumită ordine în fişele de observaţie.

Următorul pas este consultarea cheilor taxonomice care permit identificarea microorganismelor. Pentru acest pas final se utilizează *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Succesul obţinerii rezultatelor dorite impune utilizarea unor tehnici meticuloase, interpretarea inteligentă a rezultatelor obţinute precum şi o investigare atentă a datelor. Măiestria utilizării metodelor aseptice pentru obţinerea culturilor pure precum şi realizarea corectă a însămânţării bacteriei analizate se vor oglindi în rezultatele obţinute. Contaminarea culturii bacteriene cercetate cu alte culturi va conduce la obţinerea unor rezultate false. De asemenea, dacă există motive de îndoială în ceea ce

priveşte validarea rezultatelor unui anumit test este necesară repetarea acestuia.

8.1. OBŢINEREA ŞI PĂSTRAREA CULTURILOR STOC

În ciuda folosirii metodelor aseptice la însămânţarea unei culturi bacteriene, posibilitatea contaminării ei creşte odată cu frecvenţa folosirii. Prin utilizarea unei singure eprubete este foarte posibilă contaminarea culturii bacteriene pe parcursul experienţelor. De asemenea, poate interveni şi îmbătrânirea acesteia, deoarece pentru realizarea tuturor testelor de identificare este necesar un timp mai îndelungat (2-3 săptămâni). Din această cauză este necesară realizarea culturii stoc.

Diferitele microorganisme necesită petru realizarea culturilor stoc, diferite medii de cultură, însă pentru cele folosite în acest experiment este suficientă folosirea drept mediu de cultură, a agarului nutritiv (geloza) înclinat.

Pentru fiecare bacterie necunoscută se vor însămânţa două eprubete cu geloză înclinată:

- prima va fi folosită drept rezervă (cultura stoc);
- a doua va fi folosită pentru experienţele propriu-zise.

Cultura stoc (rezervă) nu va fi folosită pentru realizarea frotiurilor sau pentru inoculări de rutină; ea va fi păstrată după termostatare la frigider.

Cultura cu care se lucrează va fi folosită pentru executarea frotiurilor şi pentru însămânţare. Odată cu îmbătrânirea culturii sau deteriorarea ei (datorită folosirii), cultura bacteriană va fi înlocuită cu o cultură proaspătă, provenită din cultura stoc.

După însămânţarea bacteriei, cele două eprubete cu mediu înclinat vor fi incubate timp de 24-48 ore, la temperaturi diferite (Fig. 69): o eprubetă este incubată la 20^0 C – temperatura camerei, iar cealaltă la 37^0 C.

Aceasta ne permite evaluarea temperaturii optime de dezvoltare a bacteriei cercetate. Deşi temperatura de 20^0 C este considerată a fi temperatura camerei, eprubetele trebuie incubate în termostat şi nu lăsate la temperatura camerei unde se efectuează experienţa deoarece, temperatura din incintă este frecvent variabilă în timp.

După incubare urmează evaluarea eprubetelor însămânţate prin:

- examinarea culturii bacteriene prin aprecierea dezvoltării ei; unele bacterii necesită o examinare mai atentă a dezvoltării, în special atunci când coloniile sunt translucide şi fine;
- determinarea temperaturii care a permis cea mai bună dezvoltare;

- notarea în fişa de observaţie a temperaturii presupusă a fi optime;

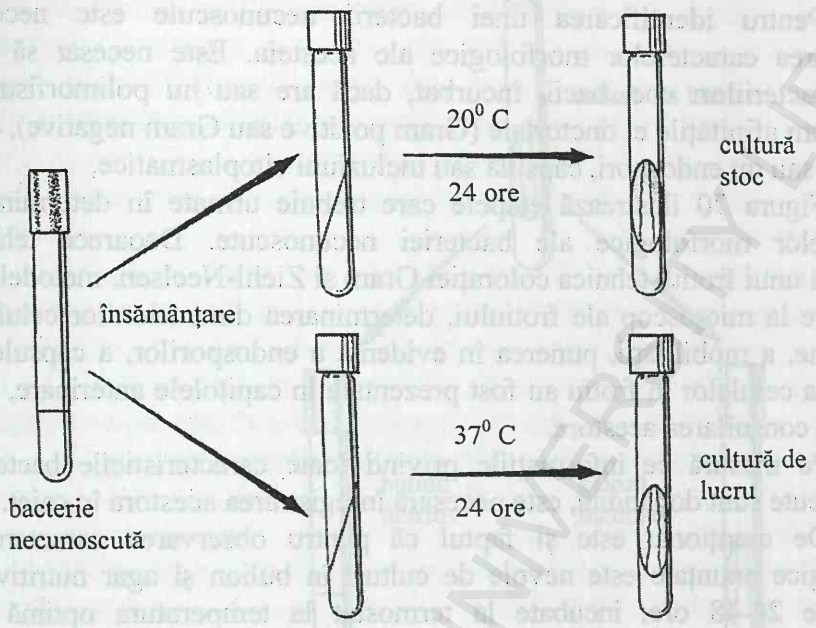


Fig. 69– Obţinerea culturilor stoc

- dacă nu se observă dezvoltarea bacteriei în nici o eprubetă, există câteva explicaţii:
  - cultura bacteriană iniţială nu a fost viabilă;
  - bacteria necesită pentru dezvoltarea sa un timp mai îndelungat;
  - este posibil ca temperaturile folosite să nu fie cele potrivite.
- se notează eprubeta cu cea mai bună dezvoltare a bacteriei, drept cultură stoc;
- dacă ambele eprubete au o dezvoltare bună, se introduc în frigider (3 - 4^0 C) până la folosirea lor; dacă una din eprubete prezintă o dezvoltare insuficientă, se va incuba la temperatura cea mai bună pentru încă 24 ore, iar cealaltă se păstrează la frigider;
- cea mai mare parte a culturilor stoc se păstrează 4 săptămâni la frigider, în schimb cei mai pretenţioşi patogeni vor supravieţui doar câtéva zile; este indicat ca realizarea culturilor bacteriene proaspete să se facă la fiecare 10 zile.

8.2. STUDIUL MORFOLOGIC AL UNEI BACTERII NECUNOSCUTE

Pentru identificarea unei bacterii necunoscute este necesară examinarea caracterelor morfologice ale acesteia. Este necesar să ştim forma bacteriilor: coc, bacil, încurbat, dacă are sau nu polimorfism, să cunoaştem afinităţile ei tinctoriale (Gram pozitive sau Gram negative), dacă prezintă sau nu endospori, capsulă sau incluziuni citoplasmatice.

Figura 70 ilustrează etapele care trebuie urmate în determinarea caracterelor morfologice ale bacteriei necunoscute. Deoarece tehnica execuţiei unui frotiu, tehnica colorației Gram şi Ziehl-Neelsen, metodele de observare la microscop ale frotiului, determinarea dimensiunilor celulelor bacteriene, a mobilităţii, punerea în evidenţă a endosporilor, a capsulei şi dispoziţia celulelor în frotiu au fost prezentate în capitolele anterioare, este necesară consultarea acestora.

Pe măsură ce informaţiile privind toate caracteristicile bacteriei necunoscute sunt dobândite, este necesară înregistrarea acestora în caiet.

De menţionat este şi faptul că pentru observarea caracterelor morfologice enunţate este nevoie de culturi în bulion şi agar nutritiv în vârstă de 24-48 ore, incubate la termostat la temperatura optimă de dezvoltare.

8.2.1. Caractere de cultură

Caracterele de cultură ale unui microorganism se referă la aspectul microscopic diferit pe care acesta îl prezintă pe mediile de cultură lichide şi solide. Cele mai utilizate medii pentru studiul caracterelor de cultură sunt agarul nutritiv, bulionul de carne şi gelatina. De menţionat este şi faptul că în afara acestor medii este necesară însămânţarea unui mediu cu tioglicolat pentru determinarea necesităţilor în oxigen ale bacteriei necunoscute.

1. Însămânţarea

Materiale necesare:

- geloză;
- gelatină;
- bullion de carne-2 eprubete;
- mediu lichid cu tioglicolat;
- o placă Petri.

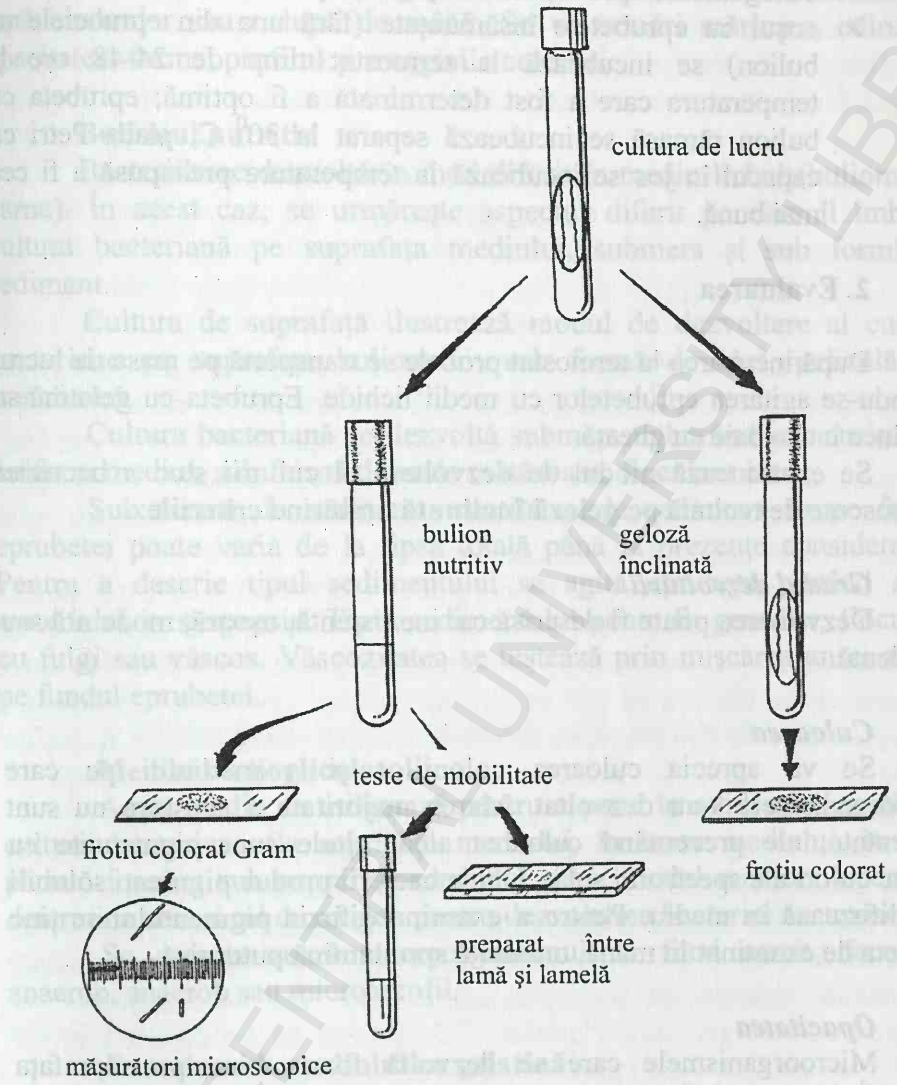


Fig. 70 – Schema de lucru pentru determinarea caracterelor morfologice ale unei bacterii necunoscute

Tehnica de lucru:

- se toarnă geloza într-o placă Petri şi se însămânţează printr-o tehnică ce permite o bună izolare a coloniilor; pentru însămânţare se utilizează cultura stoc;
- se însămânţează cu ajutorul ansei eprubetele cu bulion;
- gelatina se însămânţează cu ansa prin înţepare;

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- mediul cu tioglicolat se însămânțează cu ansa, după care pentru omogenizare eprubeta se roteşte între palme;
- coşul cu eprubetele însămânțate (fără una din eprubetele cu bulion) se incubează la termostat timp de 24-48 ore la temperatura care a fost determinată a fi optimă; eprubeta cu bulion rămasă se incubează separat la 30^0 C; placa Petri cu capacul în jos se incubează la temperatura presupusă a fi cea mai bună.

2. Evaluarea

După incubarea la termostat probele se transportă pe masa de lucru, evitându-se agitarea eprubetelor cu medii lichide. Eprubeta cu gelatină se introduce într-o baie cu gheață.

Se examinează modul de dezvoltare al culturii stoc a bacteriei necunoscute dezvoltată pe **geloză înclinată** urmărind criteriile:

Gradul dezvoltării

Dezvoltarea poate fi descrisă ca: inexistentă, uşoară, moderată sau abundentă.

Culoarea

Se va aprecia culoarea coloniilor şi a mediului pe care microorganismele s-au dezvoltat. Marea majoritate a acestora nu sunt pigmentate, ele prezentând culoarea albă, altele sunt pigmentate cu diferite culori ale spectrului solar. Unele bacterii produc pigmenți solubili care difuzează în mediu. Pentru a examina difuzia pigmentului se ține eprubeta de examinat în mână, orientată spre lumină puternică.

Opacitatea

Microorganismele care se dezvoltă foarte bine pe suprafața mediului vor apărea mai opace decât cele care prezintă o creştere slabă. Gradul de opacitate poate fi exprimat în termeni ca: opac, transparent şi translucid.

Aspectul creşterii

Se urmăreşte aspectul dezvoltării bacteriei de-a lungul liniei de însămânțare pe geloză înclinată: tipul filiform, echinulat, granulat, arborescent şi rizoidal.

Examinarea coloniilor din placa Petri

Coloniile dezvoltate pe geloza din placa Petri se examinează cu o lupă binocular sau o lupă de mână. Se va urmări mărimea, culoarea, opacitatea, forma, profilul şi marginile coloniei.

Bulionul nutritiv

Bacteriile se dezvoltă în mod diferit în mediu lichid (bulionul de carne). În acest caz, se urmăreşte aspectul diferit pe care îl îmbracă cultura bacteriană pe suprafaţa mediului, submers şi sub formă de sediment.

Cultura de suprafaţă ilustrează modul de dezvoltare al culturii bacteriene pe suprafaţa bulionului: sub formă de inel, peliculă sau membrană.

Cultura bacteriană se dezvoltă submers tulburând sau nu în mod uniform mediul, sub formă de unde mătăsoase, floculent etc.

Sub formă de sediment: cantitatea de sediment de pe fundul eprubetei poate varia de la lipsa totală până la prezenţe considerabile. Pentru a descrie tipul sedimentului se agită eprubeta punând astfel materialul în suspensie. Tipul sedimentului poate fi: granular, floculent, cu fulgi sau vâscos. Vâscozitatea se testează prin mişcarea ansei sterile pe fundul eprubetei.

Mediul cu tioglicolat

Acest mediu se utilizează pentru a pune în evidenţă dezvoltarea culturii bacteriene (la suprafaţa mediului, în masa mediului, în zona plasată imediat sub suprafaţa mediului şi pe fundul mediului) pentru a determina necesarul de oxigen pentru dezvoltarea bacteriei necunoscute.

Se caracterizează microorganismul ca fiind aerob, facultativ anaerob, anaerob sau microaerofil.

Examinarea mediului cu gelatină

Cultura bacteriană însămânţată pe mediul cu gelatină, se examinează, verificându-se mai întâi dacă a apărut lichefierea. Bacteriile capabile să lichefieze gelatina produc enzima numită gelatinază.

Lichefierea

În acest scop, se înclină eprubeta de examinat dintr-o parte în alta pentru a observa dacă vreo parte a mediului este încă lichidă, iar în cazul în care a apărut lichefierea se încadrează într-unul din tipurile cunoscute: crateriform, napiform, infundibuliform, tubular şi stratiform.

Unele microorganisme pot produce gelatinază în cantitate mică. Din acest motiv, eprubetele considerate negative trebuie incubate pentru încă 4-5 zile pentru a observa dacă într-adevăr sunt gelatinazo-negative. Dezvoltarea unei bacterii pe medii cu gelatină, fără lichefierea ei, nu prezintă importanță pentru determinările taxonomice.

8.3. STUDIUL CARACTERELOR FIZIOLOGICE ŞI BIOCHIMICE

8.3.1. Biooxidări

Testarea caracterelor morfologice şi de cultură ale unei bacterii ne pot conduce la determinarea genului pentru bacteria necunoscută. Deşi caracterele morfologice şi de cultură sunt esențiale în aflarea genului, determinarea speciei necesită informații mult mai exacte. Informațiile privind caracterele fiziologice şi biochimice care vor fi adunate mai departe vor face posibilă identificarea speciei.

Deoarece toate reacțiile fiziologice şi biochimice sunt catalizate în organismele vii de enzime şi pentru că fiecare enzimă este controlată de gene individuale, se va realiza, în esență, un profil genetic al bacteriei necunoscute pe măsură ce vor determina enzimele produse. Caracterele fiziologice care se determină se referă la chimia biooxidărilor. Reacțiile enzimatice ce intră în această categorie se referă la respirații şi fermentații.

Reacțiile de biooxidare în cazul bacteriilor sunt încadrate în funcție de energie astfel: unele de oxidare, iar altele de fermentare.

Bacteriile strict aerobe care oxidează substratele organice cu producere de CO_2 şi apă sunt numite oxidante. Prin utilizarea compuşilor organici ca donatori de electroni, cu oxigenul ca ultim acceptor de electroni, microorganismele produc CO_2 şi apă ca produşi finali, cu eliberare de energie. Acest proces este numit respirație.

Bacteriile fermentative sunt microorganisme care utilizează şi ele compuşii organici pentru obținerea de energie, dar în lipsa sistemului citocromic. Ca produşi finali, aceste bacterii produc, pe lângă CO_2 şi apă, un complex de produşi finali aşa cum sunt acizii, aldehidele şi alcooli ce pot şi ei la rândul lor să fie oxidați şi reduşi. Pentru aceste microorganisme, oxigenul nu mai este acceptorul final de electroni, reacțiile decurgând în condiții anaerobe. În cazul bacteriilor fermentative, compuşii organici funcționează atât ca donatori cât şi ca acceptori de electroni. În urma fermentațiilor rezultă şi diferite gaze ca CO_2, H_2 şi

CH_4. Glucidele, în special glucoza, sunt compuşii cei mai utilizaţi de bacteriile fermentative. Alţi compuşi, aşa cum sunt acizii organici, aminoacizii, purinele şi pirimidinele, pot fi de asemenea fermentate de microorganisme. Natura produşilor finali este determinată de tipul microorganismului, de caracteristicile substratului, condiţiile de mediu (temperatură, pH).

Deşi fermentaţia şi respiraţia reprezintă două tipuri diferite de procese producătoare de energie, ele pot fi totuşi întâlnite la acelaşi microorganism – facultativ anaerob. La bacteriile lactice, fermentaţia are loc în prezenţa oxigenului.

În cadrul reacţiilor de biooxidare vor fi studiate şase tipuri de reacţii:

- fermentaţia zaharurilor cu producere sau nu de gaz, acidifierea/neacidifierea mediului;
- testul roşu de metil;
- reacţia Voges-Proskauer (fermentaţie cu producere de butandiol);
- producerea de catalază,
- producerea de oxidaze;
- reducerea nitraţilor.

Evidenţierea proprietăţilor de utilizare a glucidelor

Numeroase specii bacteriene au proprietatea de a descompune glucidele cu formare de aldehide, acizi şi gaze (CO_2, H_2, CH_4).

Pentru a pune în evidenţă această proprietate, bacteriile se cultivă pe medii solide sau lichide la care se adaugă glucidele respective şi un indicator al reacţiei mediului.

Glucidele mai des folosite pentru cercetarea caracterelor fermentative ale bacteriilor sunt:

- ✓ **Monozaharide**:
  - pentoze: arabinoză, xiloză, ramnoză;
  - hexoze: glucoză.
- ✓ **Dizaharide**:
  - zaharoză;
  - maltoză;
  - lactoză;
  - celobioză.
- ✓ **Polizaharide**:
  - amidon;

- celuloză.

✓ **Alcooli:**
- pentavalenți: adonitol;
- hexavalenți: manitol, dulcitol, sorbitol.

✓ **Glicozide:**
- salicina.

✓ **Cicloze:**
- inozitol.

Examinarea proprietăților zaharolitice în apă peptonată cu albastru bromtimol

Materiale necesare:

- apă peptonată (Cap. 3 – Medii de cultură); se repartizează în eprubete câte 9 ml și se sterilizează la autoclav la 121^0 C, timp de 20 minute;
- soluții sterile de glucide 10% (glucoză, sucroză, lactoză); sterilizarea se efectuează prin tindalizare;
- indicator de pH - soluție de albastru bromtimol (1 g albastru de bromtimol + 25 ml NaOH 0,1 N + 475 ml apă distilată);
- cultura bacteriei martor: *Escherichia coli*;
- cultura bacteriei de identificat.

Tehnica de lucru:

Cu o pipetă sterilă se adaugă în fiecare eprubetă cu apă peptonată sterilă, câte 1 ml soluție de glucid 10%, realizându-se astfel concentrația finală a glucidelor de 1%.

Însămânțarea tulpinilor de cercetat se face cu ansa, din cultura pe agar în vârstă de 18-20 ore. După incubare (24-48 ore) la termostat, la temperatura de 28 sau 37^0 C, în fiecare eprubetă se adaugă câte 0,5 ml indicator. Dispariția culorii albastre indică metabolizarea glucidelor adăugate. Atunci când reacția se urmărește un timp mai îndelungat (7 zile) este indicat ca albastrul de bromtimol să se adauge înainte de sterilizarea mediului.

Unele bacterii pot fermenta glucidele cu producere de gaz. Acest caracter se evidențiază tot în mediu lichid, în care se introduc tuburi Durham (Fig. 71).

Escherichia coli (bacteria test) metabolizează glucidele cu acidifierea mediului și formare de gaz. Reacția în acest caz este **pozitivă**.

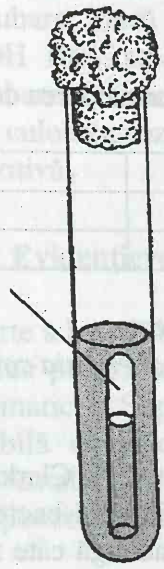


Fig. 71 – Evidențierea proprietății microorganismelor de utilizare a glucidelor

Reacția roșu de metil

Această reacție servește la determinarea concentrației ionilor de hidrogen produși de bacterii în cursul procesului de fermentare a glucozei într-un mediu glucozat și fosfatat. Un număr considerabil de enterobacterii, bacterii Gram negative, pot fi diferențiate pe baza produșilor finali ai fermentației glucozei. Genuri bacteriene ca *Escherichia, Salmonella, Proteus, Aeromonas*, fermentează glucoza cu producere de acizi (lactic, acetic, succinic, formic), CO_2 și H_2. Acumularea acizilor scade pH-ul mediului la 5 sau chiar mai puțin. Dacă reactivul roșu de metil este adăugat la o astfel de cultură se va colora în roșu, dovada faptului că bacteria respectivă poate fermenta glucoza cu producere mixtă de acizi.

Materiale necesare:

- mediu Clark și Lubs cu următoarea compoziție:

peptonă	5 g
glucoză	5 g
K_2HPO_4	5 g
apă distilată	800 ml

Ingredientele se dizolvă prin încălzire la 100^0 C, 20 minute. Se filtrează și se aduce la volumul de 1 000 ml cu apă distilată. Se repartizează

câte 5 ml în eprubete, sterilizându-se trei zile consecutiv la 100^0 C, timp de 30 minute.

- reactivul roşu de metil cu următoarea compoziţie:

roşu de metil	0,1 g
etanol 96^0	300 ml
apă distilată	200 ml

- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor: *Escherichia coli*.

Tehnica de lucru:

Se repartizează câte 5 ml din mediul Clark şi Lubs în eprubete. Se sterilizează prin tindalizare. Se însămânţează bacteria de identificat. După incubare, 3-4 zile la 28 sau 37^0 C, se adaugă câte 5 picături de soluţie din reactivul roşu de metil. Apariţia unei colorații roz sau roşii indică o **reacţie pozitivă** (o concentraţie ridicată de ioni de hidrogen), pe când apariţia unei colorații galbene indică o **reacţie negativă**. *Escherichia coli* (bacteria martor) dă în acest caz o reacţie pozitivă.

Reacţia Voges-Proskauer (reacţia acetil-metil-carbinol)

Acetil-metil-carbinolul este un metabolit rezultat din descompunerea de către bacterii a 2,3-butilen-glicocolului. Acetil-metil-carbinolul, în prezenţa alcalilor şi a oxigenului atmosferic este oxidat în diacetil care împreună cu peptona din mediu produce o culoare roz sau roşu fluorescent.

Materiale necesare:

- mediu Clark şi Lubs;
- KOH, soluţie 10%;
- $FeCl_3$, soluţie 2%;
- cultura bacteriei martor – *Enterobacter aerogenes*;
- cultura bacteriei de identificat.

Tehnica de lucru:

Mediul Clark şi Lubs se repartizează câte 5 ml în eprubete, sterilizându-se trei zile consecutiv la 100^0 C timp de 30 minute. Se însămânţează cu bacteria de identificat. După 48 ore de incubare la 28 sau

37^0 C se adaugă în fiecare eprubetă câte 5 ml KOH 10%. Citirea reacției se face după 24 ore de incubare. Dacă se adaugă o picătură de $FeCl_3$ 2%, înainte de adăugarea KOH 10%, se accelerează reacția, citirea putând fi făcută după o oră de incubare. O reacție Voges-Proskauer este considerată **pozitivă** când mediul are culoarea roz sau roşie. Cultura cu bacteria martor dă tot timpul o reacție pozitivă.

Evidențierea catalazei

Cea mai mare parte a bacteriilor aerobe şi facultativ anaerobe care utilizează oxigenul produc peroxidul de hidrogen care este toxic pentru propriul sistem enzimatic. Supraviețuirea în prezența acestui antimetabolit este posibilă deoarece aceste bacterii sunt capabile să producă enzima numită catalază. Moartea bacteriilor strict anaerobe se datorează producerii de peroxid de hidrogen dar în lipsa catalazei.

Principiul metodei:

Pentru a determina dacă o bacterie produce sau nu catalază se adaugă câteva picături de apă oxigenată peste cultura bacteriană; dacă apa oxigenată produce efervescență, microorganismul respectiv produce catalază, deci **reacția este pozitivă.**

Materiale necesare:

- mediu nutritiv;
- H_2O_2 3%;
- soluție de săpun 10%;
- cultura bacteriei martor – *Staphylococcus aureus*;
- cultura bacteriei de testat.

Tehnica de lucru:

Eprubetele cu mediu nutritiv (5 ml/eprubetă) se însămânțează cu bacteria test. După 2-3 zile de incubare la 28 sau 37^0 C în fiecare eprubetă se adaugă câte 3 ml H_2O_2 3%. În cazul unei reacții pozitive se produce o efervescență datorită degajării oxigenului conform reacției:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalaza}} 2H_2O + O_2$$

Reacția devine şi mai evidentă dacă înaintea adăugării de apă oxigenată în eprubetă, introducem 5 ml dintr-o soluție de săpun 10%.

Evidențierea producerii de oxidaze

Producerea de oxidaze este unul dintre cele mai concludente teste folosite pentru diferențierea anumitor grupe de bacterii. De exemplu, toți reprezentanții familiei *Enterobacteriaceae* dau reacții negative la acest test, în timp ce cea mai mare parte a speciilor genului *Pseudomonas* dau reacții pozitive. De asemenea și speciile genului *Neisseria* sunt oxidazo-pozitive. Mai jos sunt descrise două metode folosite pentru realizarea acestui test biochimic.

Materiale necesare:

- placă Petri cu mediul TSA (tripticază-soia-agar) însămânțată pe jumătate cu bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, iar cealaltă jumătate cu bacteria de identificat;
- reactivi pentru testul oxidazei (1% dimetil p-fenilendiamină hidroxid);
- hârtie de filtru Whatman nr. 2;
- placă Petri;
- cultura bacteriei martor – *Pseudomonas aeruginosa*;
- cultura bacteriei de testat.

Tehnica de lucru:

Metoda cu placa Petri

În placa Petri cu mediul TSA pe care au fost însămânțate cele două bacterii se toarnă reactivul pentru identificare în așa fel încât să acopere ambele bacterii. Se observă că inițial coloniile de *Pseudomonas aeruginosa* se colorează în roz, apoi în maron, roșu închis și în final în negru. Dacă bacteria de identificat urmează aceeași secvență de colorare, înseamnă că și ea produce oxidază. În acest caz, **reacția este pozitivă** și se notează cu +.

Metoda cu hârtie de filtru

Pe o bucată de hârtie de filtru aflată într-o cutie Petri se pun câteva picături de reactiv pentru testul oxidazei. Cu o ansă se preia una din coloniile de cercetat și se prelevează pe suprafața hârtiei de filtru. Reacția pozitivă, descrisă mai sus, apare în 10-15 secunde.

Reducerea nitraților

Multe bacterii sunt capabile să utilizeze oxigenul din nitrați ca acceptor de electroni în respirația anaerobă, reacții controlate de enzima numită nitratază.

Deoarece oxigenul liber previne reducerea nitraților, microorganismele care se multiplică activ vor utiliza mai întâi oxigenul şi apoi nitratul.

Materiale necesare:

- mediu nutritiv cu următoarea compoziție:

peptonă	10 g
KNO_3	10 g
apă distilată	1000 ml

Mediul se încălzeşte la flacără pentru dizolvarea ingredientelor. Apoi se filtrează prin hârtie de filtru, se repartizează în eprubete câte 10 ml şi se sterilizează prin tindalizare.

- reactiv Griess-Hosvay;
- cultura bacteriei martor – *Escherichia coli* (dă tot timpul reacție pozitivă);
- cultura bacteriei de identificat.

Tehnica de lucru:

Mediul de cultură se însămânțează cu bacteriile de studiat şi se incubează la 28 sau 37^0 C timp de 3-5 zile. După acest interval se controlează reducerea nitraților în nitriți cu ajutorul reactivului Griess-Hosvay. Acest reactiv se compune din două soluții:

Soluția I:

α-naftilamină	1 g
apă distilată	22 ml

Se încălzeşte, se filtrează şi se adaugă 1 ml acid acetic glacial diluat (400 ml în 700 ml apă distilată).

Soluția II:

acid sulfanilic	0,5 g
acid acetic diluat	150 ml

În fiecare eprubetă se adaugă câte 5 picături din soluția I şi 5 picături din soluția II.

În cazul **reacției pozitive**, după adăugarea celor două soluții, mediul se colorează în roşu; dacă nu a avut loc reducerea, mediul nu-şi modifică culoarea (**reacție negativă**).

8.3.2. Reacții de hidroliză

Multe bacterii produc exoenzime numite hidrolaze, care scindează compuşii cu structură complexă în unități mai mici. Toate enzimele hidrolitice realizează această scindare în prezența apei. Un prim exemplu de hidroliză a fost deja prezentat, când s-a pus în evidență hidroliza gelatinei (o proteină) sub acțiunea gelatinazei. În continuare, se vor prezenta hidroliza amidonului, cazeinei, lipidelor, triptofanului şi a ureei. Fiecare test prezentat joacă un rol important în identificarea unei bacterii necunoscute.

Testul de hidroliză a amidonului

Multe bacterii sunt capabile să hidrolizeze amidonul, testul având aplicații practice destul de largi.

Molecula de amidon este mare, fiind alcătuită din doi constituenți:

- *amiloza*, un polimer sub forma unui lanț drept de 200-300 unități de glucoză;
- *amilopectina*, un polimer ramificat.

Bacteriile care hidrolizează amidonul produc enzima amilază, care scindează moleculele de amiloză în maltoză şi dextrine.

Materiale necesare:

- soluție Lugol;
- cultura bacteriei de identificat (cultivată pe geloză ce conține 1% amidon);
- cultura bacteriei martor – *Bacillus subtilis*.

Tehnica de lucru:

Soluția Lugol este un indicator al amidonului. Se toarnă suficientă soluție Lugol în placa Petri ce conține cultura bacteriană de testat pentru a umezi întreaga suprafață a plăcii. Se roteşte şi se înclină uşor placa pentru a răspândi soluția Lugol uniform.Când aceasta vine în contact cu amidonul îl colorează în albastru. Dacă amidonul din mediul de cultură este hidrolizat, va apare în jurul coloniei bacteriene o zonă clară de hidroliză, iar restul mediului se va colora în albastru. Se compară **reacția pozitivă** a culturii de

Bacillus subtilis, considerată drept cultură martor, cu cea a culturii bacteriei de identificat.

Hidroliza cazeinei

Cazeina este o proteină ce se găseşte în special în lapte. Prezența ei conferă laptelui culoarea albă, caracteristică. Multe bacterii au proprietatea de a produce exoenzima numită cazeinază care hidrolizează cazeina, producând derivați transparenți mai solubili. Hidroliza proteinelor mai poartă şi numele de proteoliză. În acest scop, bacteria martor (*Bacillus subtilis*) şi bacteria necunoscută se însămânțează pe geloză care conține 1% cazeină.

Materiale necesare:

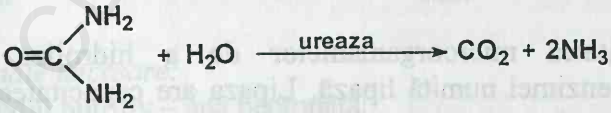
- mediu nutritiv - geloză care conține 1% cazeină;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Bacillus subtilis*.

Tehnica de lucru:

Se lichefiază mediul pe o baie de apă şi se toarnă în plăci Petri sterile. După solidificare se însămânțează cu bacteriile de identificat. Plăcile se incubează la termostat la temperatura de 28 sau 37^0 C, timp de 24-48 ore. Dacă bacteriile prezintă proprietăți proteolitice, cazeina sub acțiunea cazeinazei se peptonizează iar mediul din jurul coloniilor se clarifică.

Testul de hidroliză a ureei

Numeroase bacterii au capacitatea de a hidroliza ureea sub acțiunea ureazei, conform reacției:



Materiale necesare:

- mediul Christensen cu următoarea compoziție:

glucoză	1 g
peptonă	1 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2 g
roşu fenol	0,012 g
agar	18 g
apă distilată	1000 ml

pH=6,8

- soluție uree 20 % sterilizată prin filtrare sau tindalizare;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Proteus vulgaris* (dă tot timpul **reacție negativă**).

Tehnica de lucru:

Mediul se repartizează câte 5 ml în eprubete şi se sterilizează la autoclav la 110^0 C, timp de 20 minute. Înainte de folosire se lichefiază, se aduce la temperatura de 50^0 C şi se adaugă cu pipeta sterilă câte 0,2 ml soluție uree 20 %. Eprubetele se lasă să se răcească în poziție înclinată. Datorită reacției slab acide, mediul are culoare alb-gălbuie.

În urma însămânțării unei bacterii care hidrolizează ureea, mediul inițial galben (pH = 6,8) se colorează în roşu (pH = 8,1 sau chiar mai mare), datorită virării roşului fenol în prezența amoniacului, metabolit rezultat din descompunerea ureei. Se examinează eprubeta cu bacteria de identificat față de eprubeta martor, însămânțată cu *Proteus vulgaris* (dă tot timpul **reacție negativă**). Dacă reacția bacteriei de identificat este negativă, se incubează în continuare timp de şapte zile pentru a vedea dacă reacția nu devine pozitivă în timp.

Hidroliza lipidelor

Capacitatea microorganismelor de a hidroliza lipidele se datorează exoenzimei numită lipază. Lipaza are capacitatea de a scinda lipidele într-o moleculă de glicerol şi trei molecule de acizi graşi.

Glicerolul şi acizii graşi pot fi utilizați de microorganisme pentru sinteza lipidelor bacteriene sau a altor compuşi celulari. În multe cazuri, cei doi compuşi de hidroliză sunt oxidați pentru a genera energie în condiții aerobe. Această capacitate a bacteriilor de a descompune lipidele are rol în deteriorarea unor alimente de natură lipidică aşa cum sunt margarina, untul, grăsimile etc.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Evidențierea activității lipolitice a bacteriilor se poate realiza folosind plăci cu geloză ce conțin ulei steril.

Materiale necesare:

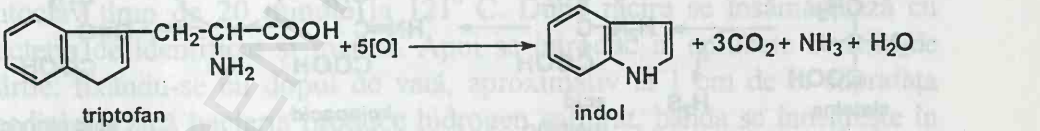
- mediu nutritiv – geloză;
- ulei de floarea soarelui steril;
- soluție saturată de $CuSO_4$;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Staphylococcus aureus* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

Se toarnă geloza simplă în plăci Petri sterile şi se emulsionează cu o anumită cantitate de ulei de floarea soarelui steril (5 ml). Se însămânțează în striuri tulpinile de studiat. După o incubare de câteva zile (3-5), placa Petri se acoperă cu o soluție saturată de $CuSO_4$. După 30 minute se îndepărtează excesul de sulfat de cupru, iar cu o lupă se examinează picăturile de ulei. Dacă o tulpină produce lipază, picăturile de ulei de sub striuri se colorează intens în albastru deschis (**reacție pozitivă**).

Hidroliza triptofanului

Unele bacterii, aşa cum este *Escherichia coli*, au capacitatea de a scinda triptofanul în indol şi acid piruvic. Enzima care catalizează această reacție de hidroliză poartă numele de triptofanază. Ea oxidează lanțul lateral al triptofanului rezultând indol, conform reacției:



triptofan indol

Materiale necesare:

- mediu nutritiv – apă peptonată;
- 2 ml KNO_2;
- 3 ml H_2SO_4 concentrat;
- 2 ml alcool amilic;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Escherichia coli* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

Se repartizează câte 10 ml apă peptonată în eprubete care se sterilizează la autoclav. Se însămânțează apoi eprubetele cu bacteria de identificat şi martor, incubându-se 48 ore la 28 sau 37^0 C. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte 2 ml soluție KNO_2, 3 ml H_2SO_4 concentrat şi 2 ml alcool amilic.

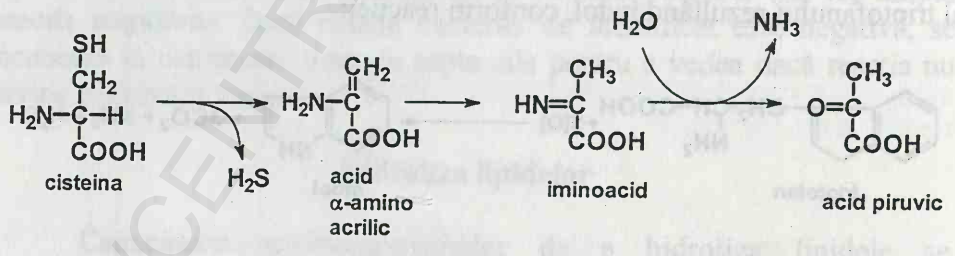
La suprafața mediului va apare un inel de culoare roşie-vişinie (**reacție pozitivă**). Acest test este utilizat în mod particular pentru a diferenția bacteria *Escherichia coli* de alte bacterii apropiate.

8.3.3. Teste diverse

Există şi alte teste utilizate în identificarea unei bacterii necunoscute care pot fi grupate cel mai bine ca teste diverse. Acestea includ teste utilizate pentru evidențierea producerii de hidrogen sulfurat, utilizarea citratului, dezaminarea fenil-alaninei, testul cultivării bacteriilor în lapte turnesolat.

Producerea de hidrogen sulfurat

Unele bacterii, ca de exemplu *Proteus vulgaris*, produc hidrogen sulfurat din aminoacizii cu sulf (cisteină, cistină etc.). Aceste microorganisme produc enzima cisteindesulfuraza. Producerea hidrogenului sulfurat este primul pas în dezaminarea cisteinei:



Producerea de hidrogen sulfurat se pune în evidență prin mai multe metode.

1. Metoda cultivării pe mediu cu acetat de plumb

Materiale necesare:

- mediu nutritiv - geloză;
- $(CH_3\text{-}COO)_2Pb$;

- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Proteus vulgaris* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

La 1000 ml mediu gelozat se adaugă 1 g de acetat de plumb. Mediul se repartizează în eprubete şi se sterilizează 20 minute la 121^0 C. Se însămânțează apoi pe suprafața mediului bacteria de identificat şi martor.

Dacă bacteria produce H_2S, mediul se înnegreşte în jurul coloniei (**reacție pozitivă**), datorită sulfurii de plumb care rezultă din combinarea H_2S şi a acetatului de plumb, conform reacției:

$$(CH_3\text{-}COO)_2Pb + H_2S \rightarrow PbS + 2\ CH_3\text{-}COOH$$

2. Metoda benzilor cu acetat de plumb

Materiale necesare:

- mediu nutritiv - bulion de carne;
- benzi de hârtie de filtru lungi de 5-6 cm, late de 1 cm, îmbibate cu o soluție de 10% acetat de plumb; se usucă şi se introduc în eprubete care se sterilizează la autoclav;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Proteus vulgaris* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

Se repartizează mediul nutritiv în eprubete şi se sterilizează la autoclav timp de 20 minute la 121^0 C. După răcire se însămânțează cu bacteria de identificat şi martor. Apoi se introduc în eprubete benzile de hârtie, fixându-se cu dopul de vată, aproximativ la 1 cm de la suprafața mediului. Dacă bacteria produce hidrogen sulfurat, banda se înnegreşte în porțiunea inferioară după 24 ore sau mai multe zile de incubare la 37^0 C (**reacție pozitivă**).

Utilizarea citratului

Capacitatea unor bacterii ca *Enterobacter aerogenes, Salmonella typhimurium* de a utiliza citratul ca unică sursă de carbon, poate constitui un criteriu important în diferențierea enterobacteriilor.

Materiale necesare:

- mediul Simmons cu următoarea compoziție:

NaCl	5 g
$MgSO_4$	0,2 g
$NH_4H_2PO_4$	1 g
K_2HPO_4	1 g
citrat de sodiu	2,67 g
agar	18 g
apă distilată	1000 ml

Se dizolvă sărurile în apă, se adaugă agarul şi se sterilizează prin autoclavare la 100^0 C, timp de 20 minute. Se ajustează pH-ul la 6,8. Ulterior se adaugă 4 ml dintr-o soluție alcoolică de albastru de bromtimol.

- albastru de bromtimol, soluție alcoolică 1%;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Enterobacter aerogenes* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

Se repartizează mediul Simmons în eprubete (7 ml/eprubetă). Se sterilizează la 121^0 C timp de 20 minute, după care mediul se solidifică în poziție înclinată. În continuare, eprubetele cu mediu se însămânțează cu bacteriile de identificat şi martor. Dacă bacteriile însămânțate au capacitatea de a folosi citratul drept unică sursă de carbon, culturile se dezvoltă, determinând o virare în albastru a culorii mediului, alcalinizându-l (**reacție pozitivă**).

Evidențierea descompunerii fenilalaninei

Acesta este un test important de a deosebi grupul *Proteus* şi *Providencia* de celelalte enterobacterii. Acest grup posedă capacitatea de a dezamina fenilalanina la acid fenilpiruvic.

Materiale necesare:

- apă de robinet sterilă;
- DL-fenilalanină, soluție 0,2%;
- roşu fenol;
- Na_2CO_3, soluție 10%;
- H_2SO_4 10%;

- $(NH_4)_2SO_4$;
- sulfat feriamonical;
- cultura bacteriei de identificat;
- cultura bacteriei martor – *Proteus vulgaris* (dă tot timpul **reacție pozitivă**).

Tehnica de lucru:

Se execută o suspensie densă a bacteriei de studiat în 0,5 ml apă robinet sterilă. Se adaugă 0,5 ml de DL-fenilalanină 0,2 %. Apoi se introduce o picătură de roşu fenol şi carbonat de sodiu 10 % suficient pentru a se crea o slabă alcalinitate. Eprubetele se închid şi se pun la incubat la 28-37^0 C în poziție orizontală timp de 4 ore. După incubare se adaugă H_2SO_4 10 % până când culoarea se schimbă în roz slab. Se saturează cu sulfat de amoniu. În continuare, se adaugă 5 picături soluție sulfat feriamonical pe jumătate saturată. Se agită bine. O culoare verzuie, variind în intensitate, indică formarea acidului fenilpiruvic (**reacție pozitivă**).

Testul IMViC

În diferențierea bacteriilor *Enterobacter aerogenes* şi *Escherichia coli* ca şi a altor specii apropiate, au fost grupate patru teste fiziologice într-unul singur, numit testul IMViC (I – indol, M – roșu de metil, Vi – Voges-Proskauer, C – utilizarea citratului).

În diferențierea celor două bacterii coliforme mai sus menționate se folosesc rezultatele testelor înscrise în tabelul de mai jos:

Specie	I	M	Vi	C
Escherichia coli	+	+	-	-
Enterobacter aerogenes	-	-	+	+

Necesitatea acestui test constă în faptul că atunci când se fac teste pentru apa potabilă, indicatorul *Escherichia coli* trebuie diferențiat net de *Enterobacter aerogenes* care are multe din caracterele morfologice şi fiziologice ale primei specii. Deoarece *Enterobacter aerogenes* este tot timpul asociat cu apele reziduale, prezența sa în apă indică tot timpul o poluare fecaloidă.

Testul laptelui turnesolat

Laptele turnesolat conține 10 % lapte degresat și cantități mici de turnesol ca indicator de pH. Când mediul se prepară, pH-ul se ajustează la 6,8. Este un mediu excelent pentru dezvoltarea multor microorganisme și poate fi utilizat cu succes la identificarea unei bacterii necunoscute. În plus, pentru a evidenția prezența sau absența fermentației, se poate detecta existența unor proprietăți proteolitice ale unor bacterii. Multe bacterii facultative cu puternice reacții reducătoare pot utiliza laptele turnesolat ca acceptor alternativ de electroni, făcându-l incolor.

Materiale necesare:

- lapte turnesolat cu următoarea compoziție:

lapte degresat	100 ml
turnesol	0,75 g
apă distilată	1000 ml

Se mojarează turnesolul, se amestecă cu laptele degresat și apoi cu apa distilată. Se repartizează câte 10 ml în eprubete și se sterilizează prin tindalizare la 100^0 C, timp de 30 minute, sau autoclavare la 115^0 C, timp de 20 minute. Nu se sterilizează la 121^0 C pentru că la această temperatură cazeina se peptonizează, iar lactoza se caramelizează și mediul capătă o culoare galbenă.

- cultura bacteriei de identificat (culturi de 24 ore în bulion nutritiv).

Tehnica de lucru:

Tuburile cu mediu de cultură se însămânțează cu 0,1 ml din cultura bacteriei de identificat în bulion. Se amestecă inoculul cu mediul prin rularea eprubetelor între palme pentru răspândirea uniformă în mediu a acestuia. Se incubează 2-5 zile la temperatura de 37^0 C.

Se pot deosebi diferite aspecte în ceea ce privește comportarea bacteriilor în acest mediu:

- ✓ **reacție acidă** – turnesolul devine roz, reacție tipică pentru bacteriile fermentative;
- ✓ **reacție alcalină** – turnesolul devine albastru sau purpuriu, ca în cazul multor bacterii proteolitice, determină o astfel de reacție în primele 24 ore;

- ✓ **reducerea turnesolului** – cultura devine albă, valabil pentru bacteriile care se multiplică activ reducând potențialul oxido-reducător al mediului;
- ✓ **coagularea** – formarea cheagului, solidificarea este datorată coagulării proteinelor; înclinând eprubeta la 45^0 se poate observa dacă reacția a avut loc sau nu;
- ✓ **peptonizarea** – mediul devine transparent, adesea maro în această etapă, reacția fiind cauzată de bacteriile proteolitice;
- ✓ **precipitarea** – reziduuri fine, subțiri pe fundul eprubetei; ea poate fi demonstrată cu ajutorul unei anse sterile.

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

9. ALTE GRUPE DE BACTERII

9.1. ACTINOMICETELE

Actinomicetele reprezintă un grup de microorganisme miceliene. Caracteristica morfologică a acestora este miceliul lor format din hife lungi, subțiri, drepte sau curbate, ramificate, cu diametrul de 0,3 - 1,3 μm, în general neseptat. Miceliul actinomicetelor formează o singură celulă. În sol sau cultivate în medii lichide, miceliul unor specii se fragmentează, dând naştere la celule cu aspect bacilar sau cocoid.

Pe medii de cultură solide, miceliul actinomicetelor formează colonii dense, cartilaginoase sau pieloase, foarte aderente de substrat. La cele mai multe specii, pe acest miceliu de substrat se formează un miceliu aerian, pe hifele căruia se găsesc sporoforii cu spori (Fig. 72).

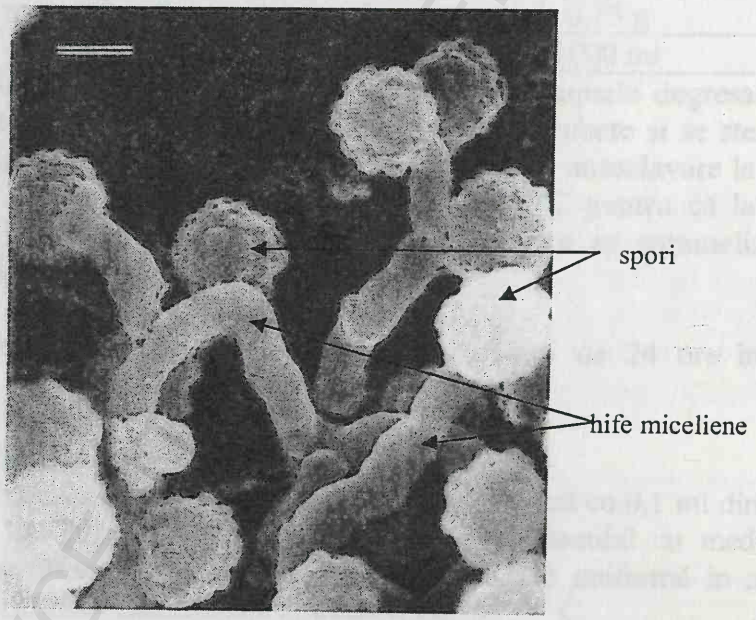


Fig. 72 – Miceliul aerian la *Streptomyces* sp. (imagine electronomicroscopică, după Tortora, Funke, Case, 2002)

Sporoforii, prin formă şi structură, sunt caracteristici diferitelor specii şi au valoare taxonomică. La unele specii sunt spiralați, cu spire lungi sau scurte, laxe sau comprimate, închise sau deschise, la altele sunt lungi, uşor încurbați sau drepți (Fig. 73).

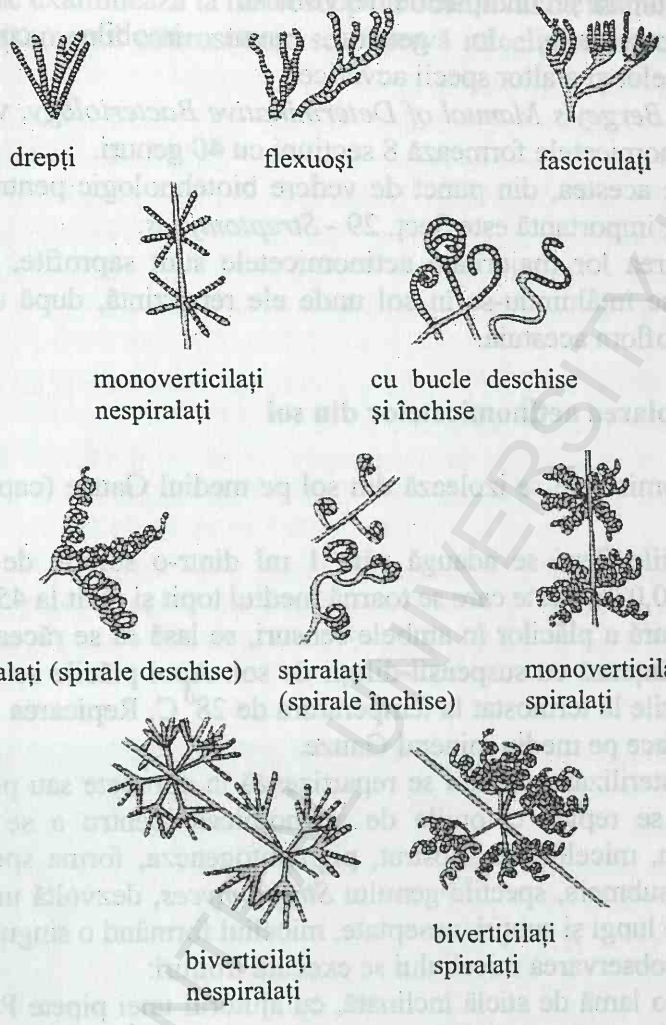


Fig. 73 – Tipuri de sporofori

Sporii la actinomicete sunt sferici sau ovali, alungiți sau cilindrici, cu extremitățile retezate. Pe suprafața lor sporii prezintă diferite ornamentații: țepi, butoni, negi, peri sau sunt netezi.

Marea majoritate a speciilor produc pigmenți. Speciile pigmentate au miceliul aerian colorat în: galben, portocaliu, roșu, violet, albastru, verde, cenușiu. Uneori, numai coloniile sunt colorate (specii cromofore); alteori pigmentul difuzează în substrat (specii cromopare). În unele cazuri, miceliul aerian are o culoare, iar miceliul de substrat altă culoare (specii

paracromofore). Pigmentogeneza este mult influențată de compoziția mediului de cultură și condițiile de dezvoltare.

Actinomicetele, în general, sunt imobile, cu excepția actinoplanaceelor și a altor specii acvatice.

După *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, vol. 4, ed. a 9[a], 1989, actinomicetele formează 8 secțiuni cu 40 genuri.

Dintre acestea, din punct de vedere biotehnologic pentru industria de antibiotice, importantă este Secț. 29 - *Streptomyces*.

În marea lor majoritate actinomicetele sunt saprofite, populațiile cele mai dense întâlnindu-se în sol unde ele reprezintă, după unii autori, 25% din microflora acestuia.

➢ Izolarea actinomicetelor din sol

Actinomicetele se izolează din sol pe mediul Gauze (cap. 3, Medii de cultură).

În cutiile Petri se adaugă câte 1 ml dintr-o soluție de sulfat de streptomicină 0,07% peste care se toarnă mediul topit și răcit la 45^0 C. După agitarea circulară a plăcilor în ambele sensuri, se lasă să se răcească, după care se însămânțează cu suspensii-diluții de sol. Apoi plăcile se incubează timp de 7-14 zile la termostat la temperatura de 28^0 C. Repicarea coloniilor dezvoltate se face pe mediu mineral Gauze.

După sterilizare, mediul se repartizează în eprubete sau plăci Petri, pe care apoi se repică coloniile de actinomicete pentru a se observa: miceliul aerian, miceliul de substrat, pigmentogeneza, forma sporoforilor etc. Cultivate submers, speciile genului *Streptomyces*, dezvoltă un miceliu format din hife lungi și subțiri, neseptate, miceliul formând o singură celulă.

Pentru observarea miceliului se execută frotiuri:

- pe o lamă de sticlă înclinată, cu ajutorul unei pipete Pasteur se prelevează miceliul dezvoltat submers;
- se lasă să se usuce la temperatura camerei;
- se fixează (timp de 10-15 minute) cu soluția Carnoy, având următoarea compoziție:

acid acetic	100 ml
cloroform	300 ml
alcool etilic	600 ml

- se colorează cu soluție de albastru de metilen 1%, timp de 5 minute;

- se spală frotiul cu apă şi se usucă;
- se examinează la microscop cu obiectivul de imersie.

La examenul microscopic se observă miceliul neseptat, colorat în albastru.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

10. DROJDIILE (LEVURILE)

Drojdiile sau levurile sunt fungi microscopici, unicelulari, a căror aparat vegetativ esre reprezentat de un dermatoplast.

Forma celulelor este variată: sferică la *Saccharomyces cerevisiae*, elipsoidală la *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, triunghiulară la *Trigonopsis sp.*, cu dimensiunile medii ale celulei cuprinse între 5,6 x 7,2 μm. Forma celulelor de drojdii poate varia în funcție de condițiile mediului, starea fiziologică şi vârsta celulelor. Se cunosc levuri monomorfe, dimorfe, polimorfe, după cum sunt reprezentate de una, două sau mai multe forme celulare.

Se înmulțesc asexuat prin înmugurire sau burjonare şi un număr mic de specii prin sciziparitate, ca şi bacteriile.

Sexuat se înmulțesc prin ascospori, care se formează în asce, în general, formându-se câte 4 ascospori şi prin basidiospori care se formează în basidii.

Levurile sunt larg răspândite în natură. Sunt adaptate la medii cu un conținut ridicat de zahăr, cum ar fi nectarul florilor sau suprafața fructelor. Solul constituie doar un mediu natural de conservare (numai sub formă de spori).

După clasificarea lui J. Webster şi H. Weber (1993), drojdiile aparțin la trei subîncrengături: ***Ascomycotina***, ***Basidiomycotina*** şi ***Deuteromycotina***.

În subîncrengătura ***Ascomycotina*** sunt incluse levurile care se reproduc în special asexuat prin înmugurire, dar au şi proprietatea genetică de a forma ascospori prin meioză.

Din punct de vedere microbiologic importantă este familia ***Saccharomycetaceae*** cu 23 de genuri, ce include specii saprofite pe fructe, rănile plantelor, alimente şi sol.

Aparatul vegetativ este un dermatoplast format din celule solitare care se înmulțesc prin înmugurire sau prin diviziune. În aceste condiții, celulele pot rămâne asociate şi pot forma pseudomicelii.

În această familie sunt incluse specii de drojdii cu implicații deosebite în procesele fermentative sau de alterare, cu importanță în industria alimentară.

Ca specii mai importante amintim:

✓ ***Saccharomyces cerevisiae (drojdia de bere)***

Caractere morfologice

- de obicei celulele au formă sferică, ovală, cu dimensiunile de (5-12) x (5-10) μm, dar uneori pot fi elipsoidale sau chiar cilindrice (Fig. 74);
- se reproduc prin înmugurire. După o incubare prelungită formează ascospori (o ască conține 4 ascospori).

Caractere de cultură

- se dezvoltă în mediu lichid, după 3 zile de incubare la 28^0 C, cu formarea unui sediment şi mai rar inel;
- pe mediu solid formează colonii cu diametrul de 1-3 mm, alb-crem, cu perimetrul circular şi suprafața lucioasă.

Răspândire şi rol

- fabricarea spirtului, obținerea drojdiei comprimate şi fabricarea unor sortimente de bere;
- obținerea unor compuşi intracelulari valoroşi pentru biotehnologii şi ingineria genetică;
- obținerea de plasmolizate, autolizate şi extracte de drojdii;
- obținerea industrială prin biosinteză a vitaminelor din grupa B şi invertazei.

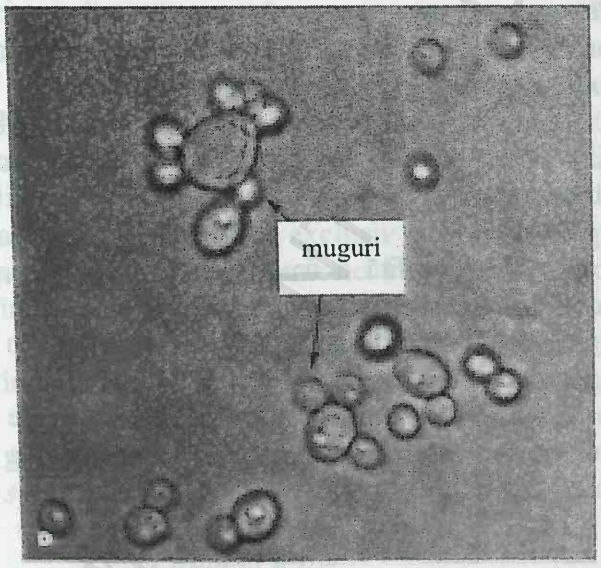


Fig. 74 – *Saccharomyces cerevisiae* (după Alexander, Strete, 2001)

✓ ***Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (drojdia de vin)**

Caractere morfologice

- celulele au o formă elipsoidală, globuloasă sau elipsoidal

alungită, cu dimensiuni (3-6) x (6-12,5) μm, dispuse singular, în perechi sau lanțuri (Fig. 75);
- înmugurirea se realizează de obicei polar, iar mugurele poate rămâne alipit de celula mamă. Poate forma 1-4 ascospori de formă sferică sau ovală.

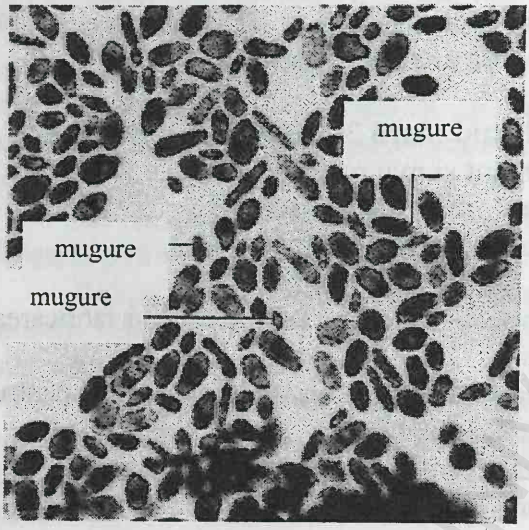


Fig. 75 – *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (după Alexander, Strete, 2001)

Caractere de cultură
- în mediu lichid produce tulburare, o spumă fină, cu aspect mat; după 24-72 ore formează un sediment granular;
- pe must de malț cu agar formează colonii ce au diametrul de 2-4 mm, cu contur circular sau slab lobat, de consistență cremoasă, aspect neted, lucios, de culoare albă sau alb cenușie.

Răspândire și rol
- este prezentă în microflora epifită a fructelor dulci (struguri, pere, mere, prune, gutui, coacăze);
- în mustul de struguri în fermentație poate reprezenta 80 % din microflora levuriană prezentă;
- din sedimentul drojdiei, rezultat în urma proceselor de vinificație, se pot obține extracte proteice de uz furajer sau pentru prepararea mediilor de cultură.

✓ ***Hansenula anomala***

Caractere morfologice

- celulele variază ca mărime şi formă; în mod frecvent celulele sunt sferice sau elipsoidale, izolate, dispuse în perechi sau grupuri mici;
- tulpinile filamentoase prezintă o mare variabilitate morfologică, atingând lungimi de 30 μm;
- în culturile bătrâne se pot diferenția hife din care unele sunt puternic ramificate.

Caractere de cultură

- pe medii de cultură solide formează colonii netede, strălucitoare sau mate, rugoase, de culoare cenuşie, cu margini dantelate. Coloniile netede, strălucitoare, sunt caracteristice tulpinilor proaspăt izolate din natură, iar celelalte tipuri se întâlnesc la tulpinile menținute prin repicare timp îndelungat în laborator.

Răspândire şi rol

- răspândită pe suprafața fructelor, poate produce alterări ale băuturilor răcoritoare şi a sucurilor de fructe.

Subîncrengătura ***Basidiomycotina*** cuprinde patru familii ce include ciuperci ce se reproduc sexuat cu formare de basidiospori. Acestea sunt implicate puțin în biotehnologii.

Subîncrengătura ***Deuteromycotina*** constituie un grup de ciuperci superioare în care sunt incluse aproximativ 30.000 specii care prezintă micelii filamentoase, cu septe transversale şi spori simpli. La unele specii lipseşte stadiul sexuat, deoarece în cursul dezvoltării filogenetice s-au adaptat la o înmulțire exclusiv asexuată. Se apreciază că foarte multe din aceste specii sunt ascomicete. Pe măsură ce se descoperă stadiile sexuate de înmulțire, deuteromicetele sunt incluse în celelalte două subîncrengături.

Fungii importanți din punct de vedere biotehnologic sunt încadrați în familia *Cryptococcaceae*, genul *Candida* şi genul *Rhodotorula*.

Speciile mai importante din punct de vedere biotehnologic ale genului *Candida* sunt: *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Candida subtropicalis*.

✓ ***Candida utilis***

Caractere morfologice

- se dezvoltă uneori sub forma unor celule sferice sau ovale, de 2-4 μm, asemănătoare levurilor şi alteori sub forma unui

BCU IASI

pseudomiceliu format din celule filamentoase, neramificate; acestea din urmă se divid prin strangulare şi dau naştere la celule de tipul levurilor.

Caractere de cultură

- în mediu lichid formează un văl alb, subțire, care în timp se depune în sediment pulverulent;
- pe medii solide formează colonii cu un perimetru slab lobat, neregulat, cu diametrul cuprins între 2,5-5,8 mm, cu suprafața având un aspect mat, cutat, de culoare alb-cenuşie sau uneori alb-crem.

Răspândire şi rol

- face parte din microbiota epifită a fructelor şi legumelor;
- în biotehnologii este o specie folosită pentru obținerea de biomasă cu conținut ridicat în proteine, utilizată pentru furajarea animalelor şi păsărilor.

✓ ***Candida albicans***

Este comensală la om şi animale, pe piele şi în cavitatea bucală sau intestin. În condiții de scădere a rezistenței organismului sau în cazul unor tratamente prelungite cu antibiotice cu spectru larg de acțiune, *Candida albicans* (Fig. 76) produce infecții cunoscute sub numele de candidoze.

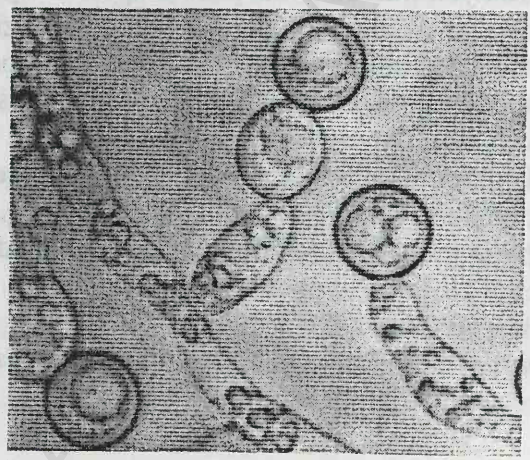


Fig. 76 – *Candida albicans* (după Wistreich, 1999)

Din genul *Rhodotorula*, cu importanță biotehnologică, menționăm specia *Rhodotorula rubra*.

✓ ***Rhodotorula rubra***

Caractere morfologice

- este o levură cu celule sferice sau ovoidale, dispuse izolat sau în perechi;
- se reproduce prin înmugurire.

Caractere de cultură

- pe medii solide se dezvoltă sub formă de colonii de culoare roşu-carmin şi au o consistenţă mucoasă;
- drojdie psichrofilă, poate creşte într-un domeniu de temperatură cuprins între 25-35^0 C;
- are o termorezistenţă mai ridicată decât a celorlalte drojdii asporogene şi poate supravieţui după o încălzire la 62,5^0 C, timp de 10 minute.

Răspândire şi rol

- este larg răspândită în natură, pe suprafaţa fructelor şi legumelor proaspăt recoltate;
- poate produce alterări ale sucurilor de mere şi căpşuni, insuficient pasteurizate;
- în biotehnologie este folosită pentru proprietatea ei de a produce provitamina A (β - carotenul), folosită pentru îmbunătăţirea în vitamine a drojdiilor furajere.

10.1. METODE ŞI TEHNICI DE STUDIU A LEVURILOR

A. Tehnici de numărare

Stabilirea numărului de celule de levuri dintr-un produs sau cultură se realizează prin diferite tehnici (C.M. Burgeois):

- numărare directă a celulelor de levuri;
- numărare indirectă (metoda Koch);
- numărare prin filtrare pe membrane în cazul produselor lichide sau solide, slab contaminate;
- numărare aproximativă prin cultivare în medii lichide (metode nefelometrice).

Metoda directă de numărare a levurilor

Camerele de numărat reprezintă lame de sticlă prevăzute cu trei platforme, dintre care platforma centrală este denivelată faţă de celelalte două cu 0,10 mm. Platformele sunt separate între ele prin rigole de sticlă. Pe platforma centrală este gravată o reţea din linii perpendiculare care delimitează o anumită suprafaţă divizată de către linii, în microcelule de

formă pătrată. Se cunosc mai multe tipuri de celule de numărare cum ar fi: camera Thoma, Türk, Bürker, Goreaev, construite pe aceleaşi principii, diferența între ele constând în suprafața unei microcelule, suprafață notată pe fiecare cameră.

Camera Thoma - frecvent folosită la numărare, prezintă gravate, pe ambele părți ale platformei centrale, câte o rețea cu suprafața de 1 mm^2 divizată în 400 microcelule elementare, deci suprafața unei microcelule este 1/400 mm^2. Se execută un preparat umed, plasând suspensia de celule pe suprafața rețelei, se aşază lamela care, sprijinindu-se pe cele două platforme laterale, va delimita înălțimea stratului de lichid, egală cu adâncimea camerei (0,1 mm). Preparatul astfel obținut se fixează de platină cu cleme iar cu ocular de 10 x şi obiectiv 45 x se caută imaginea rețelei. În câmpul microscopic, la grosisment 450, cu ajutorul platinei se pot aduce grupe de câte 16 microcelule elementare şi se face numărarea celulelor de levuri cuprinse în grupul de 4 x 4 microcelule. Se exclud de la numărare celulele levuriene care se află cu mai mult de jumătate din suprafața celulei în exteriorul careului de 4 x 4. Se fac numărări din mai multe câmpuri microscopice (minimum 10) şi se calculează numărul mediu de celule dintr-o microcelulă. Cunoscând suprafața unei microcelule precum şi volumul său (V = 1/400 x 1/10 mm^3) în funcție de diluția folosită, numărul de celule prezent într-un ml lichid de analizat se calculează cu formula:

$$N = n \times 4000 \times 1000 \times K$$

unde:
n = numărul mediu de celule/microcelulă;
4000 = volum microcelulă;
1000 = factor de transformare în cm^3;
K = coeficient de diluție.

Numărarea indirectă a levurilor (metoda Koch)

Metoda indirectă constă în însămânțarea unui volum cunoscut din suspensia de celule pe medii de cultură solidificate în plăci Petri. După o perioadă de cultivare se face numărarea coloniilor, considerând că fiecare colonie este rezultată prin multiplicarea unei singure celule.

Metoda cultivării în plăci este des folosită pentru determinarea numărului de microorganisme vii dintr-un produs alimentar şi permite în acelaşi timp o analiză calitativă prin studiul caracterelor morfologice ale coloniilor dezvoltate.

După prepararea diluțiilor prin tehnica cunoscută folosind pipete sterile pentru fiecare diluție, se recoltează câte 1 ml din suspensia

omogenizată a ultimelor trei diluţii şi prin deschiderea capacului plăcii Petri sterile se lasă să treacă numai pipeta şi se lasă să se scurgă conţinutul. Peste volumul de suspensie se toarnă mediul de cultură steril, lichefiat în prealabil pe baie de apă, răcit la o temperatură de 42-45^0 C şi imediat, prin rotire în plan orizontal al plăcii se face omogenizarea cu mediul şi se lasă în repaus pentru solidificarea mediului. Se recomandă ca din aceeaşi diluţie să se facă însămânţări în câte 3 plăci.

Plăcile cu mediile însămânţate se introduc în termostat pentru dezvoltare. Numărarea coloniilor dezvoltate se face după un anumit timp, care depinde de viteza de creştere precum şi de temperatură.

Pentru numărare se aleg plăcile în care numărul de colonii este cuprins între 50-150 (după alţi autori între 30-300). Plăcile cu un număr mai mic de 10 nu se iau în consideraţie.

Pentru determinarea numărului probabil de levuri se înmulţeşte numărul coloniilor dintr-o placă Petri cu valoarea inversă a diluţiei respective. De exemplu, dacă în placa însămânţată cu 1 ml din diluţia 10^{-3} s-au găsit 20 colonii, atunci numărul total de germeni va fi 20×10^3.

Numărarea levurilor prin filtrare prin membrane

După filtrare prin membrană, aceasta se aşază pe suprafaţa unui mediu cu geloză sau tampon de hârtie impregnat cu un mediu lichid pentru levuri. După incubare, la o temperatură şi un timp corespunzător, se numără coloniile formate la suprafaţa membranei. Membrana filtrantă pentru reţinerea celulelor de levuri trebuie să prezinte pori cu dimensiuni mai mici de 0,8 μm.

Determinarea concentraţiei celulelor de levuri prin metode nefelometrice

Metoda nefelometrică se bazează pe măsurarea intensităţii unui flux luminos difuzat de către celulele ce se găsesc în suspensie prin metoda egalării, cu ajutorul dispozitivului nefelometric.

În practica de laborator se prepară etaloane nefelometrice din sulfat de bariu stabile un an de zile. Într-o serie de zece eprubete egale se repartizează o soluţie de clorură de bariu 1% în cantităţi progresiv crescânde, începând cu cantităţi de 0,1 ml până la 1 ml. Se completează cu o soluţie de acid sulfuric 1%, până la un volum de 10 ml în fiecare eprubetă.

Opacitatea formată de sulfatul de bariu rezultat din reacţie corespunde în prima eprubetă unei concentraţii de 3×10^3 celule/ml; etalonul următor corespunde la o concentraţie de 6×10^3, al treilea etalon la 9×10^3 celule/ml. Eprubetele ce conţin etaloanele preparate se obturează cu

dopuri de cauciuc pentru a preveni concentrarea, iar în momentul folosirii se omogenizează conținutul.

10.2. TEHNICI DE APRECIERE A ACTIVITĂȚII METABOLICE A LEVURILOR

În funcție de condițiile de cultivare şi vârstă, levurile pot prezenta activitate metabolică diferențiată, concretizată prin trei stări în care se pot afla celulele şi anume:

- *starea de metabioză (activă)* în care celulele au activitate metabolică maximă. În condiții favorabile de cultură, celulele cresc, se reproduc şi acumulează intracelular substanțe de rezervă ca glicogen şi trehaloză;
- *starea de anabioză (latentă)*, celulele îşi mențin caracteristicile, dar nu se pot înmulți. Această stare apare când substanțele nutritive ale mediului sunt epuizate, iar celulele consumă din substanțele de rezervă intracelulare;
- *starea de autoliză (moartea fiziologică a celulei)*. Se produce o solubilizare a compuşilor intracelulari sub acțiunea propriilor enzime.

Pentru aprecierea activității metabolice a celulelor de levuri se efectuează următoarele analize:

Aprecierea gradului de înmugurire

Se execută un preparat umed din suspensia de celule de studiat. Din 5-10 câmpuri, diferențiate, se determină numărul total de celule şi separat, celulele înmugurite. Se face o medie şi se calculează procentul de celule înmugurite. În funcție de stadiul de cultivare, procentul de celule înmugurite poate varia de la 30-90%.

Evidențierea incluziunilor de glicogen

Se realizează prin executarea de preparate umede în care celulele de levuri sunt suspensionate în soluție Lugol. Lugolul pătrunde în celulă şi colorează incluziunile de glicogen în brun-roşcat. Prezența acestor incluziuni intracelulare în număr mare certifică starea activă în care se află levurile.

Evidențierea celulelor autolizate

O suspensie de levuri se amestecă în proporții egale cu o soluție de albastru de metilen diluat şi după 3-5 minute se execută un preparat umed.

În preparat celulele autolizate vor apărea intens colorate în albastru, comparativ cu celulele vii, necolorate.

Soluția diluată de albastru de metilen conține (g%): albastru de metilen (0,01 g), citrat de sodiu 2 · H_2O (2 g).

Albastrul de metilen pătunde atât în celulele vii cât şi în cele autolizate, dar în celulele vii sunt active reductazele, enzime care reduc indicatorul redox (albastru de metilen) la un leucoderivat incolor, încât în preparatul umed celulele vii sunt incolore. În celulele autolizate reductazele sunt inactivate şi prin urmare reacția de reducere nu are loc, în preparatul umed celulele autolizate fiind colorate în albastru.

Se apreciază cu camera Thoma numărul total de celule şi separat numărul de celule autolizate, determinându-se % celulele moarte.

10.3. METODE DE DETERMINARE A PUTERII FERMENTATIVE A LEVURILOR

Puterea fermentativă a levurilor se poate determina prin mai multe metode.

Metoda bilei de aluat

Cunoscută şi ca metoda Ostrovschi, ea determină durata de ridicare a unei bile de aluat preparată în condiții standard, ca urmare a creşterii de volum prin degajarea prin fermentație a CO_2 reținut în masa de aluat.

Tehnica de lucru:

Se cântăresc 3,12 g drojdie comprimată şi se suspendă în 50 ml apă. După omogenizare, se pipetează 5 ml care se introduc într-un mojar şi se amestecă cu 7,5 g făină. Se frământă timp de 5 minute formându-se o bilă de aluat care se introduce într-un pahar Berzelius cu 200 ml apă la temperatura de 32^0 C şi se notează timpul. Prin cronometrare se determină durata de ridicare a bilei la suprafața apei şi se apreciază astfel calitatea drojdiei (Tabel IV):

Tabel IV – Evaluarea puterii fermentative a levurilor

Timp de ridicare a bilei de aluat (minute)	Calitatea drojdiei
10 - 15	foarte bună
15 - 22	bună
22 - 30	satisfăcătoare
peste 30	slabă

Metoda de dospire

Determină durata de creştere a volumului de aluat în condiţii determinate.

Tehnica de lucru:

Se cântăresc 5 g drojdie care se amestecă cu 160 ml soluţie de sare 2,5% la temperatura de 35^0 C. Se frământă un aluat cu 28 g făină de grâu păstrată la termostat la aceeaşi temperatură. Aluatul se introduce într-o formă specială şi se cronometrează durata de creştere a aluatului până la înălţimea de 70 mm.

Determinarea capacităţii fermentative a levurilor cu ajutorul fermentometrului QE – 101 (Fig. 77)

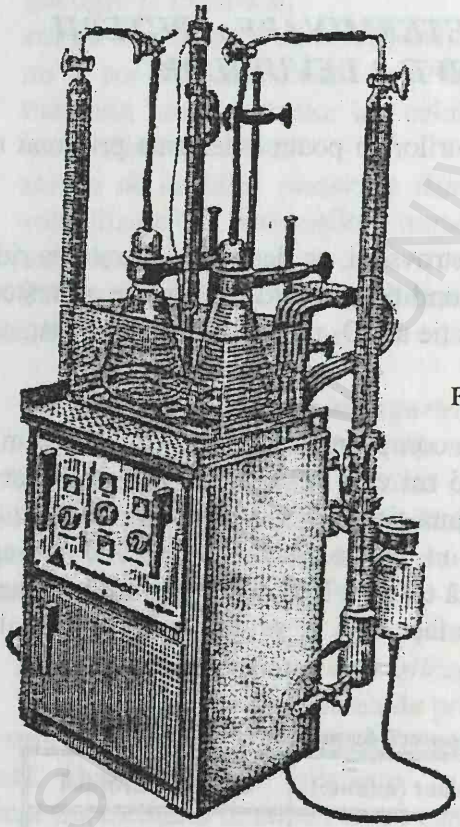


Fig. 77 – Fermentometru QE - 101

Principiul metodei:

Pentru determinarea capacităţii fermentative a unei levuri se măsoară cantitatea gazului format de 200 ml soluţie de glucoză 2,5% în prezenţa a 1% levură, în decursul a două ore, la 30^0 C.

În urma rezultatelor obținute se trage concluzia asupra calității levurilor.

Reactivi:

- Soluție 2,5% glucoză Merck: se cântăresc 5 g glucoză care se introduc într-un balon cotat de 200 ml, umplându-se balonul până la semn. Soluția de glucoză se încălzește în baia de apă la temperatura de 30^0 C.
- Se cântăresc 2 g levură de analizat şi se amestecă cu soluția de glucoză 2,5% încălzită la 30^0 C.
- Soluție NaCl 25% cu care se umple biureta de gaz până la semnul 0. La concentrația de 25% NaCl, CO_2 rezultat în urma fermentației nu se dizolvă în apă şi astfel se poate măsura.

Tehnica de lucru:

Suspensia de drojdie în soluție de glucoză se repartizează în vasele fermentometrului (în fiecare vas câte 200 ml soluție), se închid ermetic şi se scufundă în baia termostatată a aparatului la 30^0 C.

Colectarea şi măsurarea gazului (CO_2) rezultat în urma fermentației se efectuează prin cele două biurete ala fermentometrului.

Măsurătorile încep exact după 5 minute de la introducerea în baia termostatată.

Citirea cantității de CO_2 rezultat în urma fermentației se efectuează timp de două ore, din 30 în 30 minute pentru ambele biurete. În final, se face media celor două citiri.

În funcție de volumul de gaz emis în două ore se caracterizează capacitatea fermentativă a levurilor, astfel:

- peste 60 ml CO_2 → levură de foarte bună calitate;
- între 40-60 ml CO_2 → levură de bună calitate;
- între 30-40 ml CO_2 → levură de calitate mijlocie;
- între 20-30 ml CO_2 → levură de calitate slabă;
- sub 20 ml CO_2 → levură inutilizabilă.

11. FUNGII FILAMENTOŞI (MICROMICETELE)

Fungii filamentoşi sunt ciuperci saprofite sau parazite cu o organizare biologică diferenţiată şi caracteristici determinate de adaptările lor la diferite medii de viaţă.

Structura celulară a micromicetelor este de tip eucariot. Sunt heterotrofe şi adaptate la cele mai vitrege condiţii de mediu, nesuportate de alte microorganisme.

Sunt întâlnite în cele mai variate medii naturale, diferite tipuri de sol, în ape, pe substanţele organice în descompunere, produse alimentare. Există specii termofile ce se dezvoltă pe substraturi ce se autoîncălzesc (composturi) la temperaturi de 30-60^0 C. Posedând un echipament enzimatic complex, ele descompun substratul pe care se dezvoltă.

Cei mai mulţi fungi sunt saprofiţi, dar există numeroase specii parazite ce produc boli grave plantelor, animalelor şi omului.

Activitatea lor biochimică potenţială prezintă importanţă deosebită în biotehnologii, în industria alimentară şi chimică, în industria de medicamente.

Dintre ciupercile filamentoase cu importanţă microbiologică menţionăm familia *Eurotiaceae* cu două genuri: *Aspergillus* şi *Penicillium*.

Genul *Aspergillus* include în majoritate specii saprofite care pot produce mucegaiuri albicioase, verzi sau negricioase pe fructe, seminţe sau alimente. Au o deosebită importanţă practică deoarece foarte multe specii produc antibiotice.

Aspergillus niger este o specie saprofită care se găseşte în sol, pe resturi vegetale în descompunere, rădăcini, seminţe şi fructe.

Miceliul ciupercii este septat, hialin şi se dezvoltă atât în substrat cât şi la suprafaţa acestuia (aerian). Corpii de fructificare poartă numele de conidiofori care sunt neseptaţi (Fig. 78); sunt colorați brun închis, brun roşcat sau negru, de formă sferică sau globuloasă (Fig. 79).

Suşele selecţionate pot fi utilizate industrial pentru obţinerea de acizi organici: acid citric, fumaric, oxalic.

Această specie poate elibera enzime: amilaze, celulaze, pectinaze şi proteaze. Poate sintetiza lipide iar ocazional micotoxine. Prin contaminare pe calea aerului poate fi un agent producător de aspergiloze pulmonare şi bronşite alergice (Valentina Dan şi colab., 1999).

Aspergillus oryzae utilizat în obţinerea prin fermentaţia alcoolică a sucului de orez (băutură numită sake).

Aspergillus fumigatus şi *Aspergillus clavatus* produc antibiotice (fumigatina şi clavacina).

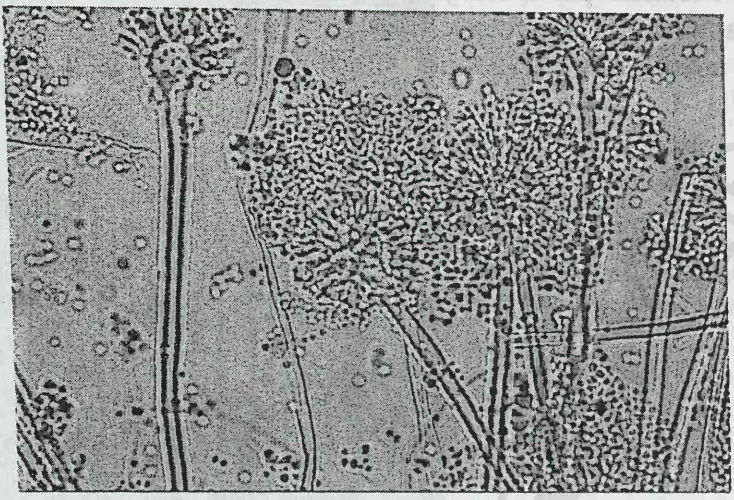


Fig. 78– Aspectul conidioforilor la *Aspergillus niger* (400 x)

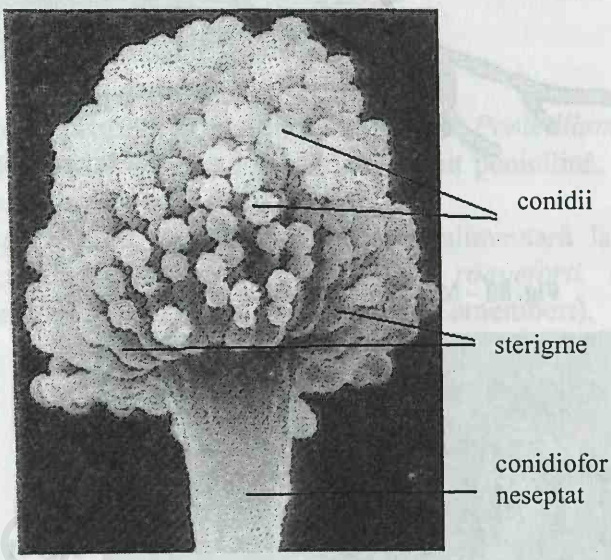


Fig. 79 – Conidiofor la *Aspergillus niger* (imagine la microscopul electronic, după Lim, 1998)

Genul *Penicillium* este considerat foarte divers datorită variabilității caracterelor morfologice specifice reprezentanților săi. Miceliul este pluricelular şi foarte ramificat. Structura reproducătoare este reprezentată de un conidiofor septat care apical prezintă metule, fialide şi fialospori

(conidii). Metulele pot fi aranjate pe un singur nivel sau pe două nivele. Aranjarea acestor elemente este caracteristică, asemănătoare cu un penson, de aici şi numele genului (lat. penicillus – smoc de păr, pensulă) – Fig. 80, Fig. 81, Fig. 82.

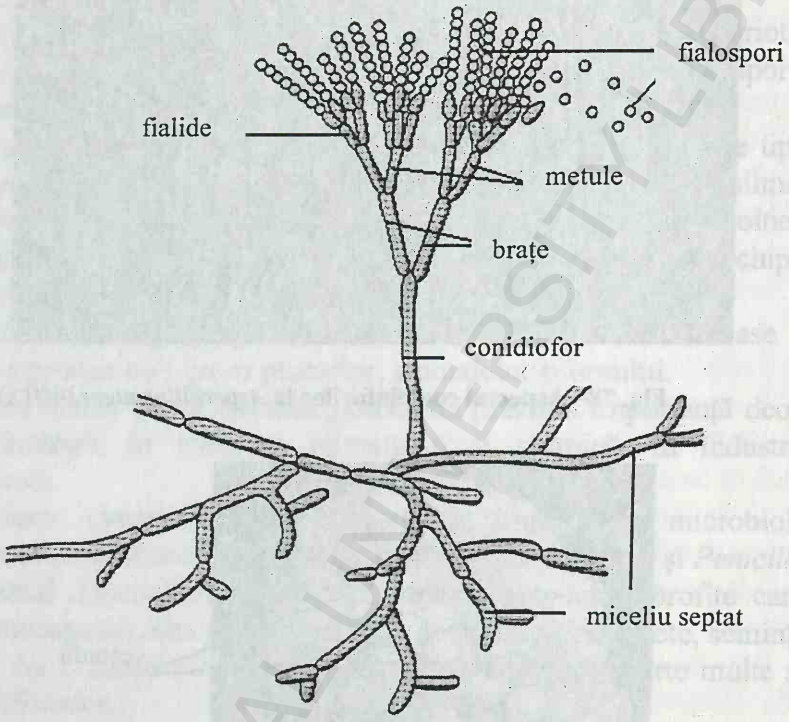


Fig. 80 – Miceliu şi fructificaţie la *Penicillium* sp.

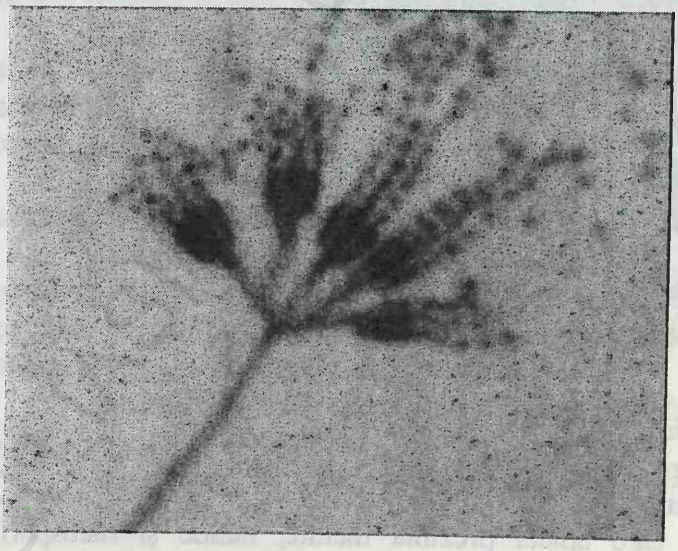


Fig. 81 – Conidiofor la *Penicillium* sp. (imagine la microscopul electronic, după Lim, 1998)

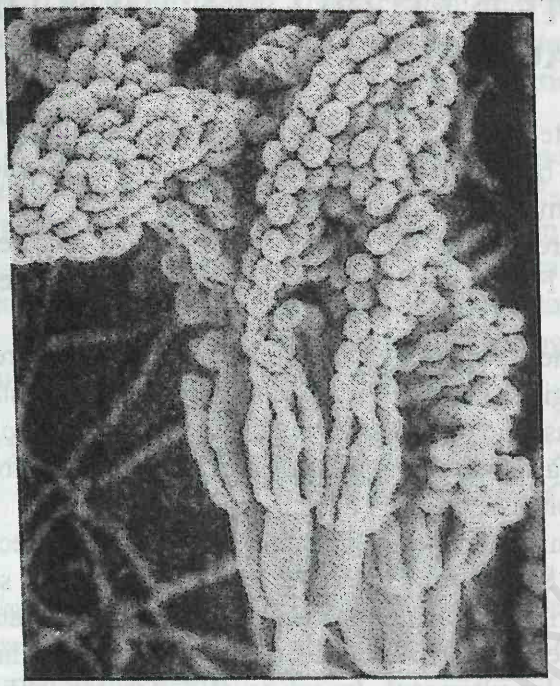


Fig. 82 – Conidiofor la *Penicillium* sp. (imagine la microscopul electronic, după Lim, 1998)

Multe specii prezintă importanță industrială: *Penicillium notatum* şi *Penicillium chrysogenum* produc antibioticul numit penicilină; *Penicillium claviforme* produce antibioticul claviformina.

Unele specii sunt utilizate în industria alimentară la prepararea brânzeturilor cu pastă albastră: *Penicillium roqueforti* (brânza de Roquefort) şi *Penicillium camemberti* (brânza de Camembert).

12. METODE FOLOSITE ÎN STUDIUL FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE

Bacteriofagii sunt foarte răspândiți în natură. Se găsesc peste tot în mediile naturale în care trăiesc bacteriile sensibile care le pot fi gazdă, adică în apă, sol, tractul digestiv al omului și animalelor.

Bacteriofagul se încadrează deci printre agenții biologici cu efect distrugător asupra bacteriilor. Fenomenul de bacteriofagie are drept efect vizibil liza bacteriană.

Sistemul fag - bacterie se pretează foarte bine la investigarea fenomenelor în sistemul biologic al relației virus - celulă gazdă și aceasta, pentru că bacteriile pot fi produse din abundență, repede, ușor și economic.

Acțiunea bacteriofagică poate fi analizată în culturi pe bulion nutritiv sau pe agar nutritiv în plăci Petri.

Liza bacteriofagică manifestă aspecte diferite, după cum se petrece în mediu lichid sau pe mediu solid. În primul caz, liza bacteriofagică se traduce prin clarificarea culturii. Dacă în populația bacteriană dezvoltată există și variante fagorezistente, acestea supraviețuiesc și vor tulbura din nou mediul, prin multiplicarea lor ulterioară. În cel de al doilea caz, când liza bacteriofagică are loc pe mediu solid, apar zone clare, lipsite de cultură pe locul unde a fost depus fagul. Aceste zone de liză sunt cunoscute sub numele de *plaje*.

Dimensiunile și morfologia plajelor sunt caracteristice pentru diferite sisteme fago-bacteriene și pot varia pentru diferiți fagi crescuți pe aceeași cultură gazdă sau pentru același fag crescut pe diferite gazde bacteriene.

Dimensiunile plajelor cresc în timpul incubației, atingând un maxim după 8-12 ore. Prin confluarea mai multor plaje se produc zone de liză confluentă. În cazul în care în populația microbiană există variante fagorezistente, acestea vor dezvolta colonii pe aria de liză.

Proprietățile bacteriofagilor

1. Specificitatea - constituie o importantă caracteristică a bacteriofagilor. Fiecare tulpină bacteriană își poate avea fagul său omolog.

2. Adaptabilitatea - este proprietatea unui bacteriofag de a se adapta, de a deveni activ față de o tulpină microbiană după cultivări repetate în prezența acelei tulpini.

3. Polivalența - capacitatea unui fag de a liza numeroase tulpini din specii bacteriene diferite.

*4. **Monovalența*** - capacitatea unui fag de a liza în mod specific numai tulpini aparținând aceleiași specii bacteriene.

În studiul fenomenului de bacteriofagie trebuie să se ia în considerare o serie de principii generale:

- pentru multiplicarea fagilor se folosesc culturi tinere de bacterii, în faza de multiplicare logaritmică (culturi de 2-3 ore în mediu lichid, obținute la rândul lor prin subcultivarea unor culturi în bulion de 24 ore);
- mediile de cultură să fie potrivite ca pH și conținut nutritiv față de cerințele nutritive specifice culturilor indicatoare și fagilor respectivi;
- să se respecte particularitățile biologice și de rezistență a fagilor în studiu, față de agenții fizici și chimici.

12.1. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII LA BACTERIOFAGI A UNEI TULPINI BACTERIENE

Din tulpina de cercetat se fac culturi în bulion în vârstă de 1-3 ore, obținute la rândul lor prin subcultivarea unor culturi în bulion de 24 ore. Ca mediu de cultură se folosește agarul nutritiv (agar 1,5 - 2 g %, pH = 7 - 7,2) turnat în plăci Petri.

Plăcile cu agar se păstrează în prealabil timp de 20-24 ore la 37^0 C pentru uscare și controlul sterilității.

Însămânțarea culturilor tinere de cercetat se face fie sub formă de arii (rotunde sau dreptunghiulare), fie prin răspândirea culturii în strat uniform pe toată placa și îndepărtarea excesului de cultură cu ajutorul unei pipete Pasteur (Fig. 83).

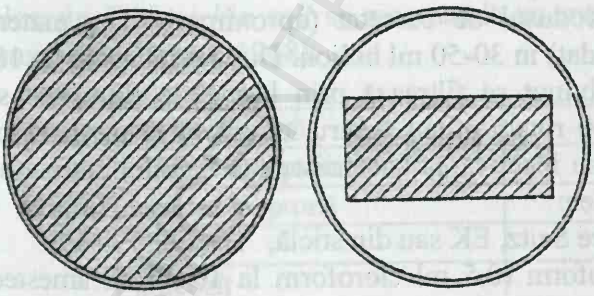


Fig. 83 – Forma ariilor de însămânțare a culturilor de cercetat

Înainte de însămânțare se desenează pe fundul plăcilor conturul ariilor pe care urmează să se depună cultura și fagii, împreună cu indicațiile acestora.

După însămânțarea culturilor, plăcile se țin în termostat la 37^0 C, cu capacul întredeschis până când agarul absoarbe complet cultura, după care

pe ariile însămânțate se depun preparatele fagice (în diluții diferite), câte o picătură, cu ajutorul unei anse cu bucla foarte fină.

Plăcile se lasă pe masa de lucru până când picăturile de fag sunt absorbite de mediu de cultură, după care se incubează la termostat cu capacul în jos.

Temperatura de incubare, ca şi durata acesteia sunt variabile în raport cu particularitățile de creştere a speciei microbiene de cercetat.

Astfel, dacă pentru majoritatea speciilor bacteriene se foloseşte temperatura de 37^0 C, pentru sistemele fago-bacteriene la stafilococi se recomandă incubarea la 30^0 C, iar pentru unele tulpini de *Salmonella typhi* la 38^0 C. În ceea ce priveşte durata de incubare, în cazul speciilor microbiene cu dezvoltarea rapidă este suficient un interval de timp de 5-6 ore, pe când altele necesită o incubare de 24 ore sau chiar mai mult.

Citirea reacțiilor litice se face în raport cu aspectul şi dimensiunile zonelor de liză (zone clare în agar).

12.2. IZOLAREA BACTERIOFAGILOR

Sursele de izolare a bacteriofagilor sunt reprezentate de diverse materiale bogate în bacterii (apa de canal, sol), cât şi de bacterii lizogene.

Prezența bacteriofagilor poate fi pusă în evidență, de asemenea, în diferite produse printre care: urină, materii fecale, exudate purulente etc.

12.2.1. Metoda directă de izolare

A - Izolarea din diferite produse

Se însămânțează produsul de cercetat (aproximativ 1 g materii fecale, 1 ml urină, 1 ml exudat) în 30-50 ml bulion. După o incubare de 18-24 ore la 37^0 C, lizatul obținut se filtrează prin hârtie de filtru sau se centrifughează la 2000-3000 rotații/minut pentru îndepărtarea particulelor mari. Pentru îndepărtarea sau inactivarea bacteriilor din lichidul obținut se folosesc următoarele procedee:

- filtrarea prin filtre Seitz, EK sau din sticlă;
- tratarea cu cloroform (0,5 ml cloroform la 10-20 ml amestec incubat), urmată de o agitare energică, după care se lasă să se limpezească câteva ore la temperatura camerei sau peste noapte la frigider şi se decantează;
- inactivarea prin căldură la baia de apă, 30-60 minute la $59\text{-}60^0$ C.

Termoinactivarea poate fi aplicată numai în cazul acelor sisteme fago-bacteriene în care fagii sunt mai rezistenți decât bacteriile omoloage, de exemplu, *Escherichia coli, Salmonella* etc.

Filtratul sau produsul inactivat urmează să fie testat pentru activitatea sa litică față de tulpini lizosensibile bine cunoscute (tulpini indicatoare).

Tulpinile indicatoare test sunt folosite în culturi tinere în bulion, în vârstă de 1-3 ore, metoda de testare fiind identică cu cea prezentată mai sus pentru testarea lizosensibilității unei tulpini microbiene.

B - Izolarea bacteriofagilor din apa de canal

Se însămânțează în 30 ml bulion un volum egal din apa de cercetat. Amestecul este incubat la 37^0 C timp de 18-24 ore, după care este filtrat sau, la nevoie, inactivat 60 minute la 60^0 C. Produsul obținut este apoi testat pentru prezența fagului litic față de tulpini indicatoare cunoscute.

C - Izolarea din sol

Într-un balon care conține aproximativ 100 ml mediu nutritiv lichid (bulion de carne) se adaugă 20-25 g sol. Acest amestec se însămânțează apoi cu bacteria de studiat. Incubarea se face la 28^0 C timp de 48 ore după care amestecul se filtrează prin hârtie de filtru dublă, pentru îndepărtarea particulelor de sol şi apoi prin filtru Seitz pentru îndepărtarea celulelor bacteriene.

D - Izolarea din culturi lizogene

Se însămânțează bacteria lizogenă în bulion de carne. Dacă se foloseşte *Escherichia coli* se recomandă un mediu nutritiv cu următoarea compoziție (Drews, 1968):

bacto-triptonă	5 g
proteoză-peptonă	5 g
cazeină-peptonă	2 g
NH_4Cl	2 g
glucoză	8 g
citrat de Na	2 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,2 g
K_2HPO_4	2 g
NaCl	2 g
extract de drojdii	0,1 g
apă distilată	1000 ml

pH= 7,0

Mediul se sterilizează la 105^0 C, 20 minute, trei zile consecutiv.

Cultivarea are loc timp de 16 ore la 30^0 C. Prin centrifugare timp de 30 minute la 3000 rotații/min, sau prin filtrare prin filtru Seitz, bacteriile se îndepărtează. Produsul obținut este apoi testat pentru prezența fagului, față de tulpini indicatoare cunoscute.

12.2.2. Metoda prin multiplicare

Această metodă se foloseşte în cazul produselor care conțin cantități foarte mici de fag ce nu pot fi puse în evidență prin metoda directă.

Principiul metodei constă în adăugarea la bulionul însămânțat cu produsul de cercetat, a câtorva picături din cultura tânără în bulion, a unei tulpini lizosensibile indicatoare.

Mai departe, tehnica de lucru este identică cu cea prezentată la metoda directă.

Multiplicarea poate fi monovalentă (cu o singură tulpină indicatoare) sau polivalentă (amestec de mai multe tulpini indicatoare). De asemenea, poate fi unică sau repetată.

În cazul multiplicărilor repetate, produsul poate fi filtrat sau termoinactivat şi apoi testat după fiecare multiplicare în parte, sau se pot face 5-10 multiplicări zilnice, după care se procedează la filtrare sau termoinactivare şi testare față de tulpinile indicatoare respective.

12.3. TITRAREA BACTERIOFAGILOR

Se efectuează diluții zecimale în bulion, ser fiziologic sau soluție tampon, din bacteriofagul de cercetat, schimbând pipeta la fiecare diluție. Apoi se foloseşte unul din procedeele următoare:

a) Pe suprafața unei plăci Petri cu agar se însămânțează tulpina lizosensibilă omoloagă, prin răspândirea culturii pe întreaga suprafață a mediului şi îndepărtarea excesului. După uscarea suprafeței însămânțate, se depune în dreptul ariilor desenate pe fundul plăcii câte o picătură din fiecare diluție de fag. Incubarea se face la 37^0 C.

Citirea rezultatelor: se face după următoarele criterii (Fig. 84); se socoteşte drept titru al bacteriofagului cercetat, ultima diluție capabilă să producă minimum o plajă.

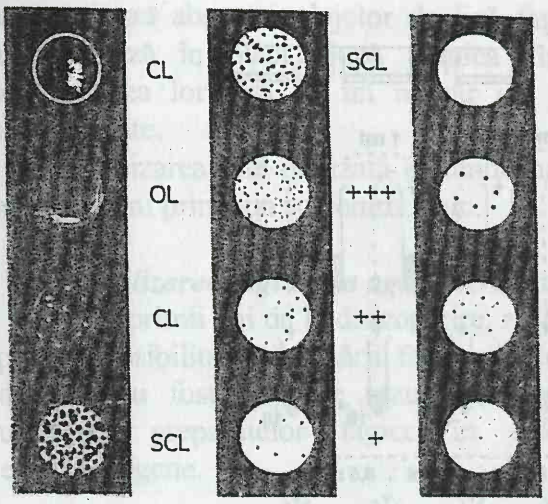


Fig. 84 – Schema şi modul de notare a gradelor de liză bacteriofagică pe medii solide.
CL=liză confluentă;
SCL=liză semiconfluentă;
OL= liză opacă (cu cultură secundară groasă);
+++ = aproximativ 100 plaje;
++ = aproximativ 50 plaje;
+ = 20-30 plaje;
n = plaje de dimensiuni normale;
s = plaje mici, în limita vizibilității cu ochiul liber;
m = plaje vizibile la lupă.

b) **Metoda dublului strat de agar** - se pregătesc atâtea plăci cu agar 2% câte diluții de fag s-au efectuat.

Paralel, se repartizează într-un număr de tuburi de hemoliză câte 0,5 ml din fiecare diluție de fag realizată, peste care se adaugă câte 0,5 ml din cultura tânără (18 ore) în bulion a tulpinii sensibile. În fiecare tub se introduce apoi câte 1 ml mediu cu agar moale, topit şi răcit la 45-50^0 C. Se omogenizează, după care amestecul din fiecare eprubetă se toarnă în câte o placă Petri cu agar 2% pregătită în prealabil (Fig. 85).

Plăcile se incubează timp de 24 ore la 37^0 C după care se citesc rezultatele. Se numără plajele de liză din fiecare placă Petri. Numărul aflat se înmulțește cu diluția, exprimându-se astfel titrul bacteriofagilor la 1 ml de filtrat.

12.4. APLICAȚIILE PRACTICE ALE FENOMENULUI DE BACTERIOFAGIE

Interacțiunea litică a cuplului fag-bacterie are câteva aplicații practice majore.

Aplicații în epidemiologie

Specificitatea relației fag-bacterie a stat la baza elaborării unui procedeu de identificare şi clasificare a bacteriilor, în funcție de sensibilitatea lor la un fag sau la un grup de fagi, fenomen denumit lizotipie sau tipizare prin fag. Metoda este folosită pentru stabilirea diagnosticului bacteriologic în clinică, dar şi în studiile de sistematică bacteriană.

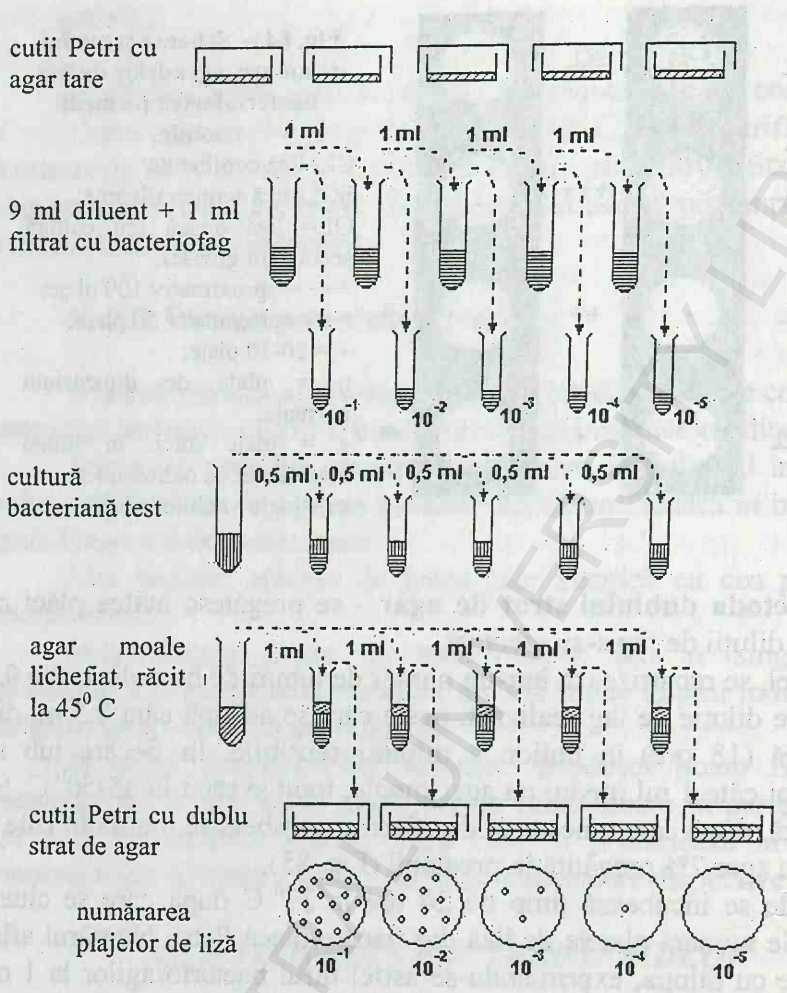


Fig. 85 – Schema titrării bacteriofagilor

Prin tipizare fagică se înțelege identificarea unei tulpini bacteriene, utilizând un set de preparate fagice purificate şi standardizate, cărora li se cunoaşte capacitatea de a liza anumite tulpini bacteriene. Tipizarea prin fag este o metodă foarte utilă în studiile de epidemiologie, pentru a reconstitui originea şi circulația unei infecții într-o colectivitate în cursul unei epidemii. Practic, toate tulpinile unei specii bacteriene patogene izolate în cursul unei epidemii de la bolnavi, de la purtători, din alimente contaminate, din vectori sau de la animalele care reprezintă izvor de infecție, având origine comună, aparțin aceluiaşi lizotip (aceluiaşi tip fagic).

Metoda se foloseşte pentru identificarea tulpinilor de *Salmonella*, *Vibrio* etc. Tipajul fagic este simplu, necesitând numai înregistrarea

prezenței sau absenței plajelor de liză fagică. În acest scop, tulpinile se însămânțează în plăci, după tehnica "în pânză" și apoi se testează sensibilitatea lor față de un număr cât mai mare de preparate fagice standardizate.

Tipizarea este realizată în centre naționale unde pot fi tipizate mai multe tulpini printr-un screening unic.

Utilizarea fagilor ca agenți terapeutici

În primii ani de la descoperire, au fost realizate numeroase cercetări privind posibilitatea utilizării fagilor în terapia antibacteriană. În ultimul deceniu au fost obținute rezultate experimentale pe animale, privind utilizarea preparatelor fagice în infecții cu tulpini de bacterii enteropatogene.

Implicațiile fagilor în procesele industriale

Infecția fagică a bacteriilor utilizate în procesele industriale reclamă măsuri serioase de prevenire. De exemplu, culturile starter de streptococi lactici utilizate la fabricarea brânzeturilor sunt susceptibile la atacul fagilor corespunzători, necesitând utilizarea unor culturi starter mixte sau a unui mediu fără calciu. De asemenea, unele actinomicete utilizate la producerea antibioticelor sunt susceptibile la atacul fagilor (actinofagi), ceea ce necesită măsuri adecvate.

Utilizarea fagilor ca instrumente de cercetare

Importanța fagilor în studiile fundamentale de biologie a fost și continuă să fie foarte mare. Astfel, o serie de descoperiri ca: deducerea naturii de triplet a codului genetic, testul de complementație (cis-trans) și multe altele, care stau la baza cercetărilor actuale de genetică, au fost realizate cu ajutorul fagilor.

BCU IASI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

13. STUDIUL PRINCIPALILOR FACTORI CARE CONDIȚIONEAZĂ STAREA DE IMUNITATE

Imunitatea reprezintă nereceptivitatea organismului față de un agent infecțios sau față de o anumită substanță străină. Această stare de nereceptivitate este condiționată de ansamblul tuturor adaptărilor organismului transmise pe cale ereditară sau câștigate în cursul vieții individuale, precum și de totalitatea proceselor care tind să restabilească constanța mediului intern al organismului.

Aparatul defensiv antimicrobian cu care organismele sunt înzestrate este constituit dintr-o serie de factori, care după felul cum intervin în apărarea organismelor pot fi clasificați astfel:

A. Factori de apărare pasivi: tegumentul, mucoasele, tensiunea O_2 în țesuturi, indiferența țesuturilor față de toxinele microbiene etc.;

B. Factori de apărare activi, care se împart la rândul lor în:

a. factori de apărare activi de natură celulară - fagocitoza și pinocitoza;

b. factori de apărare activi de natură umorală - specifici (anticorpii) și nespecifici (lizozimul, sistemul alexină - properdină, interferonul etc.).

13.1. FACTORII CELULARI AI IMUNITĂȚII (IMUNITATEA CELULARĂ)

Imunitatea celulară reprezintă unul din principalele mijloace de apărare ale organismului uman sau animal față de pătrunderea unui agent străin microbian sau de altă natură.

În apărarea contra agenților străini organismul utilizează două mecanisme deosebit de importante și anume: **fagocitoza** (înglobarea de elemente corpusculare) și **pinocitoza** (înglobarea de macromolecule).

Fagocitoza reprezintă un proces complex ce cuprinde o serie de faze ce duc la înglobarea și digerarea intracelulară a particulelor străine pătrunse în organism, atunci când natura chimică a acestora o permite. Proprietatea de a fagocita o au anumite celule "libere" sau "fixe" ale organismului numite **fagocite**.

Ansamblul tuturor celulelor cu proprietăți fagocitare constituie **aparatul (sistemul) fagocitar**. Acesta este reprezentat de celule cu morfologie variată și localizări diferite dar având comună capacitatea de fagocitoză și pinocitoză.

13.1.1. Principalele tipuri de celule cu proprietăți fagocitare

F a g o c i t e:

1. **Mobile** (din sângele circulant):
   a) *microfage*:
      - polimorfonucleare (granulocite): neutrofile, eozinofile, bazofile;

   b) *macrofage*:
      - mononucleare (agranulocite): monocite.

2. **Tisulare** (elemente ale S.R.E.):
   a) *macrofage "călătoare"*:
      - histiocit;
      - macrofag tisular;
      - monocit sanguin;

   b) *celule reticulo-endoteliale "fixe"*:
      - celule endoteliale din sinusurile sanguine din: ficat (celule Kupffer), splină, măduvă osoasă, hipofiza anterioară, cortex suprarenal;
      - microglia (sistem nervos central);
      - celule reticulare din sinusurile limfatice din: ganglioni limfatici, foliculi limfatici (plăci Peyer), amigdale, splină, timus.

Pentru observarea fagocitelor din sângele circulant se fac frotiuri de sânge recoltat din pulpa degetului.

Materiale necesare:
- lame de sticlă;
- cristalizoare cu capac;
- baie de colorat Laveran;
- alcool metilic;
- soluție May-Grünwald;
- soluție Giemsa;
- apă distilată neutră.

Tehnica de lucru:

Se recoltează o picătură proaspătă de sânge pe fața inferioară a extremității libere a unei lame curate și foarte bine degresate. Lama pe care s-a făcut recoltarea este sprijinită cu marginea inferioară pe extremitatea dreaptă a lamei orizontale, în așa fel încât să formeze cu aceasta un unghi de 45^0 (Fig. 86). Stratul de sânge obținut trebuie să fie subțire și cel puțin

una din marginile frotiului să fie dreaptă și să păstreze o anumită distanță până la marginea lamei. Frotiurile se usucă prin agitare în mână.

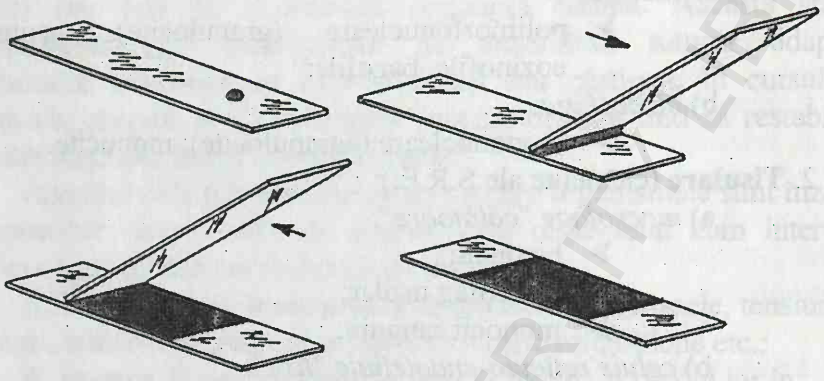


Fig. 86 – Executarea frotiului de sânge

Colorarea frotiurilor de sânge se face prin **metoda May-Grünwald-Giemsa**. Se recomandă colorarea lor imediat după uscare. În frotiurile de sânge nefixate și necolorate, celulele se alterează, își pierd afinitatea tinctorială și nu mai reproduc fidel toate detaliile mofologice.

Tehnica de lucru:

Datorită amestecului de coloranți acizi, bazici și neutri, se vor colora toate componentele celulelor sanguine, în funcție de afinitățile lor tinctoriale (colorație panoptică).

Colorarea se realizează în doi timpi, în cristalizoare acoperite sau în băi speciale de colorare – tip Laveran.

Timpul I:

Fixarea – se realizează prin acoperirea frotiului cu 15-20 picături din soluția May-Grünwald (care se găsește gata preparată). După trei minute se adaugă peste această soluție același număr de picături de apă distilată neutră și se lasă încă două minute (apa distilată neutră cu pH=7-7,2 se obține prin neutralizarea apei distilate cu o soluție de carbonat de sodiu 1 %). Se verifică pH-ul foarte corect.

Soluția May-Grünwald realizează fixarea frotiului și totodată colorarea elementelor acidofile și a granulațiilor neutrofile ale leucocitelor.

Timpul II:

Se îndepărtează soluția de pe lamă și fără să se spele, se acoperă cu soluție Giemsa diluată astfel: două picături soluție Giemsa la un ml apă distilată neutră. Soluția Giemsa preparată extemporaneu se lasă 20-30 minute, apoi lama se spală cu apă de robinet, se usucă și se examinează la imersie.

Reușita colorației depinde de: calitatea și concentrația colorantului; timpul de colorare; pH-ul apei, acest din urmă factor fiind foarte important deoarece, cu soluție prea alcalină se obține o exagerare a azurmetacromaziei elementelor, cu alterarea acțiunii eozinei. Soluțiile prea acide exagerează eozinofilia și maschează efectul azurmetacromaziei.

Într-o colorație panoptică reușită, aspectul tinctorial al hematiilor apare cu o nuanță roz-roșiatică. Soluția May-Grünwald colorează bine citoplasma granulocitelor și granulațiile respective, iar soluția Giemsa colorează foarte evident nucleul și granulațiile azurofile.

Coloratia Giemsa rapidă

Frotiul de sânge uscat bine prin agitare în aer se acoperă cu alcool metilic, timp de cinci minute, apoi se colorează astfel:

- se acoperă lama cu soluție Giemsa diluată (două picături colorant la un ml apă distilată neutră) și se menține 45 minute;
- se spală cu apă de robinet, se usucă la temperatura camerei și se examinează la imersie.

Colorații nereușite

1. Frotiu cu nuanță roz-roșie, datorită pH-ului final acid al soluției colorante datorită fie apei, fie colorantului; uneori și o spălare prelungită a frotiului cu apă acidă poate duce la acest rezultat.
2. Frotiu albastru – cauze: pH-ul final al soluției colorante a fost alcalin datorită fie apei, fie colorantului; supracolorarea lamei; spălarea insuficientă; frotiu prea gros.
3. Frotiu cu precipitate – cauze: în cursul colorării frotiul s-a uscat; spălarea a fost insuficientă; s-a produs sedimentarea colorantului în sticlă (caz în care trebuie filtrat).
4. Frotiu supracolorat – caz în care se va decolora cu alcool metilic.
5. Frotiu insuficient colorat – se va recolora cu soluție Giemsa.

Examinarea frotiurilor de sânge colorate se face la marginea lor, acolo unde fagocitele (leucocitele) din sânge sunt bine conservate și în număr mai mare.

Fagocitele (leucocitele) mononucleare sau agranulocite

Monocitele sunt celule mari, cu diametrul cuprins între 15-25 μm, cu nucleul voluminos, ovalar, reniform sau în formă potcoavă, slab colorat. Citoplasma, în cantitate mare, este slab bazofilă, de nuanță spălăcită, cu rare granulații azurofile, în proporție de 4-5 %. Monocitele trec și în spațiile extravasculare jucând rol de macrofage.

Fagocitele (leucocitele) polimorfonucleare sau granulocite

Au un nucleu cu aspect polimorf, fragmentat în 2-6 lobi, uniți unul de altul prin câte un fir subțire de cromatină. Nucleul este colorat în violet. Citoplasma ușor acidofilă conține granulații specifice. Granulocitele se clasifică după morfologia și afinitatea lor tinctorală în:

- ✓ **neutrofile** (granulațiile din citoplasmă de culoare violet-roz), se găsesc în condiții normale în proporție de 65-70 %;
- ✓ **eozinofile** (acidofile) se găsesc în proporție de 1-3 %;
- ✓ **bazofile**, cu granulații puține în citoplasmă, de culoare violet-neagră, care uneori se suprapun și peste nucleu; se găsesc în proporție de 0,5 – 1 % (Fig. 87).

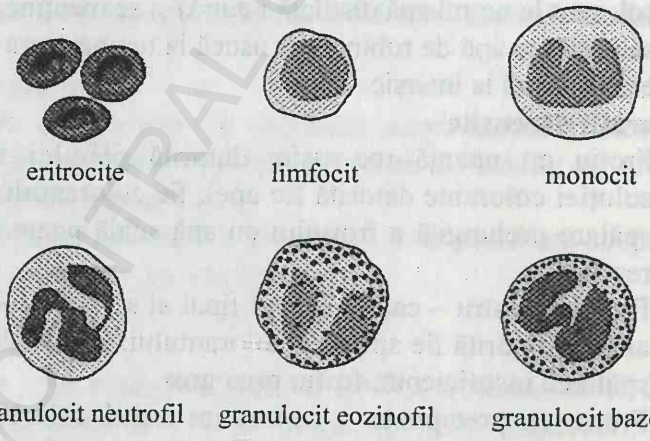


Fig. 87 – Elemente figurate din sânge

Neutrofilele au ca funcție importantă fagocitarea bacteriană. Datorită prezenței lor în sânge în număr mare, migrării și mobilizării lor rapide ca urmare a chimiotactismului lor, ele constituie prima linie a apărării celulare.

Leucocitele eozinofile au capacitate fagocitară mai redusă.

13.1.2. Studiul fenomenului de fagocitoză

Mişcarea leucocitelor şi înglobarea microbilor pot fi urmărite prin metode mai simple sau mai complicate.

O metodă simplă este observarea fenomenului direct într-o picătură de sânge. Pe o lamă de microscop se aşază o picătură dintr-o suspensie de stafilococ care se lasă să se usuce, iar pe o lamelă se pune o picătură de sânge obținută prin înțeparea degetului. Se aşază apoi lamela pe lamă în aşa fel încât să se formeze un strat subțire de sânge între lamă şi lamelă. Lamela se lipeşte pe margini cu vaselină sau cu parafină cu punct de topire 56^0 C, cu ajutorul unei spatule încălzite, pentru a împiedica evaporarea sângelui. La un microscop cu platina încălzită la 37^0 C se vor observa mişcările amoeboidale ale polimorfonuclearelor în direcția stafilococilor pe care-i înglobează.

Punerea în evidență a fagacitozei "*in vivo*" şi "*in vitro*"

Pentru punerea în evidență a fagocitozei "*in vivo*" se procedează mai întâi la obținerea unui exudat leucocitar. Se inoculează intraperitoneal la cobai, în două reprize, apă peptonată: prima inoculare se face cu 20 ml, iar cea de a doua, după un interval de 2-3 ore, se face cu 10 ml apă peptonată.

După 2 ore de la ultima inoculare de apă peptonată, cobaii sunt injectați, tot intraperitoneal, cu 5 ml suspensie de stafilococ, inactivată în prealabil timp de 30 minute la 60^0 C. La un interval de 30 minute de la inocularea suspensiei bacteriene, se extrage prin puncție exudatul peritoneal în soluție anticoagulantă (citrat de Na 2,5 %), din care prin centrifugare se separă leucocitele. Depozitul de leucocite obținut se spală de 2-3 ori în soluție fiziologică (soluție salină 0,85 %) şi se readuce, în final, în suspensie. Din această suspensie se fac frotiuri, se colorează prin metoda May-Grünwald-Giemsa şi se examinează la imersie pentru a observa numărul de celule de stafilococ înglobate în citoplasma fagocitelor.

Pentru punerea în evidență a fagocitozei "*in vitro*", exudatul leucocitar se obține prin procedeul prezentat anterior.

Într-o eprubetă se amestecă în volume egale suspensia de leucocite spălate, suspensia de stafilococ şi ser proaspăt de cobai care conține opsonine (anticorpi naturali care facilitează fagocitoza). După o bună amestecare a conținutului, eprubeta se introduce în termostat la 37^0 C, având grijă să se agite uşor amestecul din 10 în 10 minute.

Pentru urmărirea etapelor procesului de fagocitoză (mobilizarea leucocitului spre corpul fagocitabil, adeziunea şi înglobarea) se execută

frotiuri la diferite intervale de timp (15, 20, 30 şi 45 minute) care se colorează şi se examinează la imersie.

13.1.3. Determinarea indicelui opsono-citofagic, ca interrelație între procesele celulare şi cele umorale de imunitate

Interrelația dintre procesele celulare de imunitate şi cele umorale a fost stabilită încă din 1895, când s-a semnalat pentru prima dată prezența în serurile imune a unor substanțe cu acțiune sensibilizantă asupra bacteriilor, făcându-le astfel mai uşor fagocitabile. Mai târziu s-a constatat că substanțe cu aceeaşi acțiune de sensibilizare a bacteriilor pentru procesul fagocitar se găsesc şi în serul normal. Aceste substanțe au fost denumite **opsonine** (de la cuvântul grecesc "opsao" = pregătesc pentru mâncare).

Opsoninele din serul imun (imunoopsoninele) sunt termostabile, au acțiune specifică asupra bacteriilor şi se deosebesc de opsoninele prezente în serul normal care sunt termolabile şi au acțiune asupra bacteriilor în general şi mai puțin asupra unei anumite bacterii care a produs infecția.

Puterea opsonizantă a unui ser se pune în evidență prin determinarea indicelui opsono-citofagic.

Tehnica reacției opsono-citofagice

Materiale necesare:

- leucocite obținute din sângele uman sau exudat peritoneal de cobai;
- suspensia microbiană (între 1 şi 4 miliarde celule bacteriene pe ml, în funcție de bacteria aleasă);
- serul de cercetat;
- serul normal-martor.

Obținerea leucocitelor:

În cazul folosirii leucocitelor din sângele uman, se va începa cu un ac de seringă steril pulpa degetului şi se recoltează cca. 20 picături de sânge în soluție anticoagulantă în proporție de 8 părți soluție şi o parte sânge. Soluția anticoagulantă se prepară din clorură de sodiu 8,5 g, citrat de sodiu 15 g, apă distilată 1000 ml.

Amestecul de sânge şi soluție anticoagulantă se centrifughează, se îndepărtează supernatantul, iar depozitul se spală de 3 ori, prin centrifugare, cu câte 10 ml ser fiziologic. Se îndepărtează lichidul de spălare. Depozitul rămas va prezenta un strat superficial format din leucocite şi un strat

profund format din globule roșii. Se înclină tubul și se aspiră leucocitele cu o pipetă bine efilată, apoi se depun într-un tub cu diametrul mic.

Pentru obținerea leucocitelor de cobai se provoacă un exudat peritoneal, prin inocularea intraperitoneală a 30 ml bulion steril sau apă peptonată sterilă. După 1-2 ore se punctionează peritoneul cobaiului și se recoltează exudatul bogat în leucocite. Recoltarea se face tot în soluție anticoagulantă iar leucocitele obținute sunt spălate prin centrifugare cu soluție salină, ca și în cazul leucocitelor din sânge.

Prepararea suspensiei microbiene

Din cultura tânără de 12-24 ore a tulpinii bacteriene dezvoltată pe mediu solid, se prepară o suspensie în soluție fiziologică care să fie cât mai omogenă și opalescentă.

Serul de cercetat

Sângele recoltat se lasă la termostat 2-3 ore, pentru separarea cheagului de ser. Serul obținut se poate păstra la frigider 3-4 zile. Serul martor (normal) se recoltează de la un individ sănătos, folosind aceeași tehnică.

Tehnica de lucru:

Se amestecă în cantități egale, serul, suspensia de germeni și leucocitele. Se termostatează amestecul timp de 30 minute la 37^0 C. Concomitent se face același amestec folosind în locul serului de cercetat un ser normal martor. Din aceste amestecuri se fac frotiuri pe lame curate, degresate, se fixează în alcool absolut și se colorează cu albastru de toluidină sau soluție Giemsa. În cazul speciei *Mycobacterium tuberculosis* se utilizează coloratia Ziehl-Neelsen (încălzirea efectuându-se la 37^0 C).

Citirea rezultatelor:

Se examinează 100 leucocite polimorfonucleare, făcându-se suma numărului microbilor conținuți în fiecare leucocit. În cazul unui leucocit care nu a fagocitat nimic, se scrie la calcul 0. Suspensia microbiană este bine făcută când se obține la martor un număr de 2-4 microbi fagocitați pe leucocit. Notarea se va face numai pentru leucocitele bine colorate și distincte. În cazul unei fagocitări intense, când microbii sunt în număr prea mare și nu pot fi numărați se va scrie întotdeauna cifra 9.

Puterea opsonică a serului rezultă din împărțirea numărului de microbi găsiți în 100 de polimorfonucleare, la 100.

Indicele opsono-citofagic se determină din raportul dintre puterea opsonică a serului de cercetat și puterea opsonică a serului martor (normal).

Exemplu: dacă în 100 de leucocite polimorfonucleare s-au găsit 300 microbi, atunci puterea opsonică a serului cercetat va fi:

$$\frac{300}{100} = 3$$

Dacă serul normal are puterea opsonică 2 şi serul de cercetat are puterea opsonică 3, indicele opsono-citofagic va fi egal cu:

$$\frac{\textit{puterea opsonica a serului cercetat}}{\textit{puterea opsonica a serului martor}} = \frac{3}{2} = 1,5$$

Indicele ospono-citofagic se foloseşte în scop diagnostic şi prognostic în unele infecţii (aprecierea evoluţiei unei infecţii).

13.2. REACŢIILE DINTRE ANTIGEN ŞI ANTICORP (REACŢII SEROLOGICE)

În afara organismului ("*in vitro*"), atunci când punem în prezenţă serul unui animal imunizat cu antigenul care a servit la imunizare, sau serul unui bolnav cu microorganismul care a produs infecţia ori cu produsele lui toxice, acţiunea antagonistă a anticorpilor din acest ser se manifestă în diferite moduri şi este cunoscută sub numele de **reacţie antigen-anticorp (Atg-Atc)**. Acţiunea dintre Atg şi Atc poate fi uşor pusă în evidenţă prin reacţii serologice.

Aspectul pe care îl îmbracă reacţia dintre antigen şi anticorp este variat în funcţie de natura antigenului:

- ✓ dacă antigenul este reprezentat de o suspensie de celule bacteriene, sub acţiunea anticorpilor specifici se produce o aglomerare (aglutinare) treptată a celulelor bacteriene cu formarea unor granule vizibile cu ochiul liber, ce se depun pe fundul tubului de reacţie. În acest caz, reacţia dintre antigen şi anticorp poartă numele de **reacţie de aglutinare (seroaglutinare)**. Antigenul este denumit **aglutinogen** iar anticorpii **aglutinine**;
- ✓ când antigenul este reprezentat de o soluţie coloidală, sub acţiunea anticorpilor se formează un precipitat vizibil care se depune. Reacţia dintre antigen şi anticorp poartă, în acest caz, numele de **reacţie de precipitare (seroprecipitare)**. Antigenul este denumit **precipitinogen**, iar anticorpii **precipitine**;

- ✓ când antigenul este alcătuit din celule lizabile (corpi microbieni sau hematii) şi dacă reacția are loc în prezența complementului (alexinei), atunci sub acțiunea anticorpilor specifici se produce imunocitoliza (bacterioliza sau hemoliza). Reacțiile care au loc în acest caz poartă numele de **reacții de liză**, iar anticorpii - **lizine (bacteriolizine şi hemolizine)**;
- ✓ dacă antigenul este o substanță toxică (o toxină microbiană), acțiunea ei toxică poate fi neutralizată sub acțiunea anticorpilor denumiți **antitoxine**. Reacția poartă numele de reacție de **neutralizare (seroneutralizare)**.

Reacțiile dintre antigen şi anticorp pot fi evidențiate calitativ şi cantitativ. Reacțiile cantitative permit evaluarea titrului anticorpilor prezenți într-un ser.

Prin **titrul anticorpilor** într-un ser se înțelege diluția maximă a serului care mai dă o reacție pozitivă cu o cantitate cunoscută, constantă, a antigenului corespunzător.

Reacțiile antigen-anticorp au o largă utilizare, în practică.

Aplicațiile reacției decurg din însăşi specificitatea ei:

- ✓ un antigen necunoscut poate fi identificat prin anticorpul corespunzător cunoscut. În acest scop, sunt utilizate **seruri de referință** (seruri imune cu anticorpi cunoscuți, destinate identificării unor antigene);
- ✓ un anticorp cunoscut poate fi identificat prin antigenul corespunzător (antigen de referință).

13.2.1. Reacția de aglutinare (seroaglutinarea)

Există mai multe modalități tehnice de efectuare a acestei reacții.

Reacția de aglutinare în tuburi (reacție cantitativă)

Reacția pentru identificarea unui anticorp necunoscut.

Materiale necesare:
- tuburi (eprubete) de aglutinare;
- antigenul (o suspensie bacteriană standardizată nefelometric);
- serul de cercetat;
- soluție cloruro-sodică 8,5 g ‰;
- pipete gradate;
- baie de apă.

Tehnica de lucru:

Se aşază un număr de tuburi de aglutinare în stativ, în raport cu numărul diluţiilor de ser pe care dorim să le realizăm. Se notează pe fiecare tub diluţiile finale de ser. Ultimul tub din serie va servi drept martor (M). Se repartizează câte 0,5 ml soluţie cloruro-sodică începând cu al doilea tub al seriei, inclusiv tubul martor. Într-o eprubetă separată se face diluţia iniţială a serului de cercetat 1/10 (1 ml ser + 9 ml soluţie cloruro-sodică). Din această diluţie de ser se vor repartiza câte 0,5 ml în tuburile 1 şi 2. Din tubul 2 se va lua 0,5 ml amestec şi se va trece în tubul 3. Se repetă această operaţie şi în celelalte tuburi până la penultimul tub din serie, din care, după amestecare, se scot şi se aruncă 0,5 ml. Ultimul tub (tubul martor) nu conţine ser de cercetat. Se adaugă apoi în toate tuburile de reacţie câte 0,5 ml antigen (diluat în mod diferit în funcţie de antigenul utilizat). Cantitatea finală de amestec în toate tuburile va fi de 1 ml. Tubul martor conţine numai soluţie NaCl şi antigenul. El foloseşte şi la controlul antigenului folosit în reacţie, care uneori poate da aglutinări spontane ce conduc la rezultate false (Tabel V).

Tabel V – Schema reacţiei de aglutinare în tuburi

Componentele reacţiei	Numărul tubului								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Soluţie cloruro-sodică 8,5 g ‰ (ml)	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser de cercetat diluat 1/10 (ml)	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→	0,5→ se aruncă	-
Antigen (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Diluţiile finale de ser	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	-

După repartizarea suspensiei microbiene, tuburile se agită şi se incubează la termostat sau la baia de apă. Temperatura şi timpul de incubare variază cu antigenul. În general, temperatura de incubare este de 37^0 C, iar timpul, de 2 ore pentru reacţiile cu antigene flagelare şi 20 ore pentru cele cu antigene somatice.

Citirea rezultatelor

Se face cu ochiul liber sau cu aglutinoscopul. O primă citire se face după scoaterea tuburilor din termostat (sau baia de apă) şi o citire definitivă după 24 ore.

În tubul martor suspensia bacteriană trebuie să fie omogenă. În tuburile în care reacţia este pozitivă, bacteriile sunt aglutinate, depuse pe fundul tubului iar lichidul de deasupra este clar. În tuburile în care nu s-a produs aglutinarea, ca şi în tubul martor, suspensia bacteriană rămâne omogen-opalescentă, fără depozit. Pentru examinare, tuburile vor fi uşor agitate.

Gradul de pozitivitate al reacţiei se notează astfel:

++++ = aglutinare completă, lichid clar;
+++ = lichid clar sau aproape clar, depozit însemnat;
++ = lichid neclar, depozit mic;
+ = lichid neclar, depozit neînsemnat;
± = reacţie îndoielnică;
- = absenţa aglutinării - suspensia omogen-tulbure.

Diluţia maximă a serului la care mai apare fenomenul de aglutinare, reprezintă **titrul aglutinant** al serului cercetat. Aceasta constituie în practica curentă de laborator, modul concret de apreciere cantitativă a aglutininelor.

Reacţia de aglutinare în tuburi este larg folosită ca reacţie de diagnostic: diagnosticul salmonelozelor, brucelozei, tularemiei, colibacilozei etc.

Reacţia de aglutinare poartă numele diferiţilor autori care au introdus-o ca metodă de diagnostic la diferite specii microbiene (reacţia Widal, reacţia Wright, Weill-Felix etc.).

Reacţia de aglutinare pe lamă

Este o reacţie care permite decelarea calitativă a anticorpilor dintr-un ser, dar nu şi aprecieri cantitative.

Materiale necesare:

- lame de microscop;
- antigenul (diluat în soluţie cloruro-sodică);
- serul de cercetat;
- serul normal provenit de la aceeaşi specie animală de la care provine şi serul examinat.

Reacţia se poate efectua punând pe lamă 3 picături după următoarea schemă (Fig. 88).

În cazul prezenţei anticorpilor specifici în serul de cercetat, se produce aglutinarea corpilor bacterieni şi reacţia este considerată pozitivă (2).

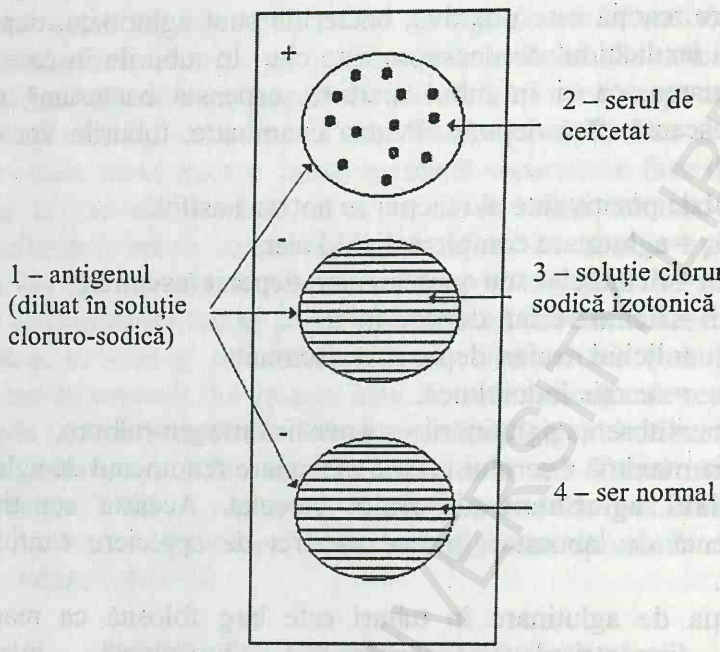


Fig. 88 – Schema aglutinării rapide pe lamă

În cazul absenței anticorpilor din ser, suspensia își păstrează omogenitatea și reacția este negativă.

Dacă serul normal (4) al unei specii animale conține aglutinine nespecifice față de antigenul folosit în reacție, se trage concluzia că acest ser nu se pretează pentru diagnosticul serologic.

Picătura de soluție cloruro-sodică (3) la care s-a adăugat și o picătură de antigen servește drept martor (M) pentru bacteriile care aglutinează spontan în ser.

Seroaglutinarea pe lamă este o metodă rapidă, orientativă, ușor de executat chiar în absența unui laborator utilat. Se folosește în cazul când se urmărește identificarea unor antigene bacteriene. Rezultatele pozitive ale reacției de aglutinare pe lamă trebuiesc confirmate prin reacția de aglutinare în tuburi.

13.2.2. Reacția de precipitare (seroprecipitarea)

Precipitarea este rezultatul acțiunii anticorpilor specifici (precipitine) dintr-un ser imun asupra substanței precipitabile (precipitinogen), în prezența electroliților.

Antigenul (precipitinogenul) este reprezentat în acest caz de un extract microbian, o toxină, ser provenit de la diferite specii animale, extracte din țesuturi și organe etc. (în general, un antigen molecular).

Reacția de precipitare are o mare sensibilitate. Ea poate pune în evidență cantități infime de antigen prezent în soluție. Această proprietate a făcut ca reacția de precipitare să aibă o largă utilizare practică, ca reacție de diagnostic, la identificarea apartenenței de specie, în controlul produselor alimentare etc.

Reacția de seroprecipitare se execută după numeroase tehnici. Se cunosc două procedee de bază pentru punerea în contact a celor două elemente de reacție și anume:

- ✓ precipitarea în mediu lichid;
- ✓ precipitarea în mediu gelozat (imunodifuzie).

Fiecare din aceste procedee are la rândul lui mai multe variante tehnice.

Precipitarea în mediu lichid

Această reacție poate fi executată din punct de vedere calitativ (când se urmărește numai evidențierea cuplului antigen-anticorp) și cantitativ (când se determină titrul unuia din elemente, de regulă cel al anticorpilor).

Tehnica reacției de precipitare în inel

Materiale necesare:

- eprubete de precipitare (eprubete înguste, cu diametrul de 3-4 mm);
- eprubete de hemoliză;
- pipete Pasteur;
- antigenul (reprezentat de o soluție proteică);
- serul imun (care conține anticorpii specifici);
- soluție cloruro-sodică izotonică.

Tehnica de lucru

În eprubete de hemoliză perfect curate și uscate se realizează diluarea antigenului* după următoarea schemă (Tabel VI):

---

* Spre deosebire de reacția de aglutinare, în reacția de precipitare se diluează antigenul în serie și nu serul imun (anticorpii). Din acest motiv, în mod obișnuit se determină nu diluția limită a serului imun, ci diluția limită a antigenului care mai dă încă o reacție cu serul imun nediluat.

Tabel VI – Schema reacției de precipitare în inel

Componentele reacției	Numărul eprubetelor								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Soluție cloruro-sodică 8,5 g ‰ (ml)	-	1	1	1	1	1	1	1	1
Antigen (ser de om) diluat 1/10 (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Diluțiile finale de ser	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	-

După efectuarea diluțiilor se pipetează în tuburile înguste de precipitare cca. 0,2-0,5 ml din fiecare diluție de antigen realizată, începându-se cu diluția cea mai mare spre cea mai mică. Apoi, cu ajutorul unei pipete Pasteur se lasă să curgă foarte încet pe peretele tubului serul imun (antiserul) în același volum ca antigenul, fără ca cele două componente ale reacției să se amestece. Tuburile se incubează la termostat, la 37^0 C, timp de 30-60 minute.

După scoaterea de la termostat, se citește reacția urmărindu-se apariția la interfața celor două lichide a unui inel alb de precipitare. Reacția este pozitivă dacă se formează inelul de precipitare. Absența inelului respectiv indică o reacție negativă ca și în tubul martor.

Se consideră ca titru al serului, ultima diluție la care mai apare un inel alb cu contur net și care prezintă stabilitate la o ușoară agitare.

Reacția de precipitare în inel se folosește cu precădere pentru identificarea unor antigene microbiene, umorale sau tisulare, folosind seruri de referință corespunzătoare.

Reacția de precipitare în gel (imunodifuzia)

Capacitatea anticorpilor de a precipita specific antigenul corespunzător, poate fi pusă în evidență nu numai prin amestecarea lor directă ci și prin difuzia lor într-un mediu gelificat.

Metodele de imunodifuzie se pot clasifica pe baza numărului elementelor care difuzează, în:

- ✓ **metode de difuzie simplă** (când anticorpul este încorporat în mediu gelificat iar antigenul este lăsat să difuzeze în acest mediu);
- ✓ **metode de difuzie dublă** (când atât anticorpul cât și antigenul se introduc în două regiuni diferite ale gelului și difuzează unul spre celălalt).

Tehnica (metoda) difuziunii duble, introdusă de Ouchterlony și Flek, este cel mai frecvent folosită.

Materialele necesare:
- gel de agar;
- antigenul;
- serul imun (anticorpii);
- lame de sticlă de diferite dimensiuni.

Geloza pentru imunodifuzie se prepară astfel: 12 g agar Noble (Difco) se amestecă cu 600 ml apă distilată și se lasă la temperatura camerei până a doua zi pentru umflarea agarului. A doua zi se mai adaugă 600 ml tampon-veronal pH = 8,6. Se fierbe amestecul la baia de apă (pentru topirea agarului) aproximativ 10-15 minute. Se repartizează în eprubete sau flacoane închise cu dopuri de vată.

Tampon veronal:

veronal sodic	10,3 g
veronal acid	1,84 g
mertiolat de sodiu (conservant)	0,1 g
apă distilată	1000 ml

Tehnica de lucru:

Pe lame de sticlă curate și așezate pe o suprafață perfect plană se toarnă geloza topită în așa fel încât stratul de gel să fie, după solidificare, de aproximativ 0,5 cm. Se practică apoi în masa gelului mai multe godeuri în funcție de numărul probelor folosite în reacție. Aranjarea acestora poate fi variată (Fig. 89). De regulă, serul imun care conține anticorpi se amplasează în godeul central iar în godeurile periferice mai mulți antigeni (sau același antigen in diferite diluții). Amplasarea poate fi și inversă dacă se urmărește reacția unui antigen cu mai multe seruri.

Plăcile astfel preparate se așază în cristalizoare cu capac, în care se va menține o atmosferă umedă prin punerea unui tampon de vată umed. Se introduc apoi în termostat la 37^0 C sau se lasă la temperatura camerei timp de câteva zile.

Atât antigenul cât și anticorpii vor difuza în masa gelului și în zona de întâlnire a celor doi reactanți vor apare linii evidente de precipitare. Se notează liniile de precipitare care corespund unor fracțiuni antigenice cu viteză și coeficient de difuzie diferite.

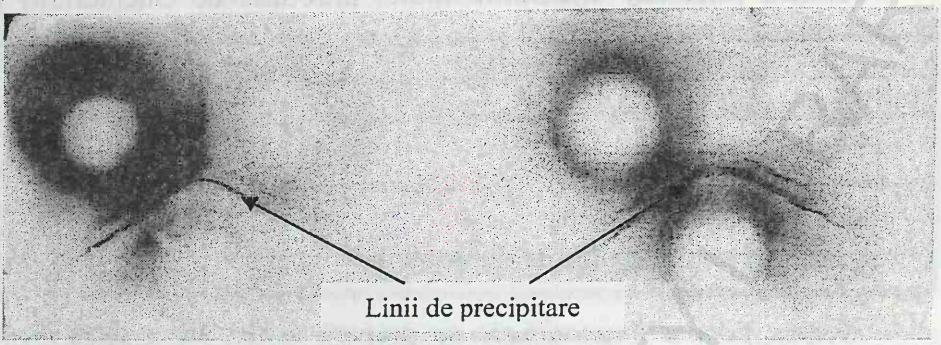


Fig. 89 – Dubla difuzie după Ouchterlony

Pentru citirea rezultatelor lamele sau plăcile de sticlă se pot colora prin diferite metode, pentru o mai bună evidențiere a liniilor de precipitare.

Aplicații ale reacției de precipitare

Utilizarea reacției de precipitare ca metodă de diagnostic în bolile infecțioase

În bacteriologie, reacția de precipitare ca metodă de diagnostic, se utilizează în două scopuri:

- pentru a cerceta puterea precipitantă a serului imun uman sau animal față de filtratele unor culturi microbiene corespunzătoare. În acest caz, o reacție pozitivă demonstrează prezența în serul imun a anticorpilor specifici (precipitinele);
- pentru punerea în evidență a precipitinogenului din diferite extracte de organe, atunci când nu putem izola agentul cauzal al bolii.

Utilizarea reacției de precipitare în medicina legală (reacția Uhlenhut)

Cu ajutorul acestei reacții se poate preciza cu certitudine dacă o pată de sânge proaspătă sau veche (uscată) găsită pe o haină etc., este de origine umană sau animală.

Pentru efectuarea reacției se vor utiliza mai multe seruri precipitante: anti-om, anti-cal, anti-bou, anti-oaie etc.

Se diluează pata de sânge suspectă de pe fragmentul de stofă sau țesătură în câțiva ml de ser fiziologic. Se filtrează, iar lichidul clar obținut ce servește ca antigen este pus în contact, în tuburi de precipitare, cu diluții din diferite seruri precipitante. Tuburile se țin 30 minute la 37^0 C și apoi se

citesc rezultatele. Dacă se produce precipitarea în tuburile în care s-a pus ser precipitant anti-om, în diluții mari, reacția este considerată pozitivă, pata de sânge fiind de origine umană. În cazul în care nu s-a produs precipitarea la nici unul din serurile utilizate, se trage concluzia că pata de sânge are o altă proveniență. Pentru a se afla originea, se vor utiliza alte seruri precipitante.

Utilizarea reacției de precipitare în controlul alimentelor

Reacția poate fi utilizată pentru diferențierea originii cărnii date în comerț. Se poate deosebi astfel carnea de oaie de carnea de porc, cal etc., indiferent dacă produsul este proaspăt sau conservat.

În acest scop, se va pune în contact un extract apos de carne cu diferite seruri precipitante (anti-porc, anti-cal, anti-oaie, anti-bou etc.). Se poate preciza în cazul unei reacții pozitive cu unul din aceste seruri, ce origine are carnea sau dacă este vorba de un amestec de diferite cărnuri.

13.2.3. Reacția de hemoliză

Hemoliza imună este fenomenul de lizare a hematiilor de către un ser imun hemolitic corespunzător care conține anticorpi specifici (hemolizine).

Hemolizinele apar în serul animalelor inoculate cu hematii provenite de la alte specii animale şi au proprietatea de a liza aceste hematii în prezența alexinei.

Titrarea activității unui ser hemolitic

Materiale necesare:
- serul imun hemolitic (de exemplu serul imun anti-oaie);
- antigenul (hematii de oaie);
- alexina (complementul);
- soluție cloruro-sodică izotonică 8,5 g ‰;
- eprubete de hemoliză;
- pipete;
- baloane cotate.

Pregătirea materialelor necesare reacției:

Serul hemolitic anti-oaie se obține prin imunizarea iepurelui cu o suspensie de hematii de oaie, spălate prin centrifugare cu o soluție cloruro-sodică şi readuse la volumul inițial. Se practică una sau două inoculări la un

interval de 3 zile. Sângele se recoltează din vena marginală a urechii, iar după coagulare serul se separă prin centrifugare.

Antigenul (hematiile de oaie) se obține prin recoltarea în mod steril a sângelui de oaie din vena jugulară, într-un balon cu perle de sticlă pentru defibrinare. Hematiile astfel obținute sunt spălate prin centrifugare în soluție cloruro-sodică de mai multe ori, până ce lichidul supernatant este perfect limpede. După îndepărtarea supernatantului, din depozitul de hematii spălate se face o suspensie de 1,5 % în soluție cloruro-sodică.

Alexina (complementul), se folosește în reacție diluată 1/10. Se folosește fie alexină conservată, fie ser proaspăt de cobai, care conține alexină.

Tehnica de lucru :

Din serul hemolitic de titrat se fac diluții succesive (diluția 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 etc). Se repartizează din fiecare diluție câte 1 ml în tuburi de hemoliză. Se adaugă apoi câte 1 ml suspensie 1,5 % de hematii de oaie.

Amestecul de ser de cercetat şi suspensia de hematii se incubează la 37^0 C, timp de o oră. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte 0,5 ml alexină diluată 1/10 şi se agită bine. Volumul final al amestecului este de 2,5 ml. Reacția se citeşte după o nouă incubare de 30 minute la 37^0 C.

Ultimul tub din serie este tubul martor (M) care nu conține ser de cercetat. Acesta conține 1 ml soluție cloruro-sodică, 1 ml suspensie de hematii şi 0,5 ml alexină (Tabel VII).

Tabel VII – Schema titrării serului hemolitic

Componentele reacției	Numărul tuburilor								
	1	2	3	4	5	6	7	8	M
Ser imun hemolitic (ml)	1 dil. 1/100	1 dil. 1/200	1 dil. 1/400	1 dil. 1/800	1 dil. 1/1600	1 dil. 1/3200	1 dil. 1/6400	1 dil. 1/12800	1 ml sol. cloruro-sodică
Hematii de oaie 1,5% (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Alexină diluată 1/10 (ml)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

În eprubetele în care a avut loc hemoliza lichidul se înroşeşte şi soluția devine limpede. Pe fundul eprubetelor se depune stroma hematiilor lizate.

Titrul serului hemolitic este reprezentat de cantitatea de ser care, în volumul total de 2,5 ml şi în prezența a 0,5 ml de alexină diluată 1/10, a produs în timp de 30 minute liza totală a 1 ml globule roşii suspensie 1,5% (se va considera întotdeauna tubul cu hemoliza totală).

Reacția de hemoliză are o largă aplicabilitate practică. Sub numele de *"reacția de fixare a complementului"* (R.F.C.) se utilizează în diagnosticul diferitelor infecții: sifilis (reacție cunoscută sub numele de reacția Bordet-Wassermann), febră tifoidă, gonococii cronice, leptospiroze, infecții virotice şi rickettsiene.

14. DETERMINAREA SENSIBILITĂȚII BACTERIILOR LA ANTIBIOTICE (ANTIBIOGRAMA)

Determinarea sensibilității bacteriilor la antibiotice şi chimioterapice este obligatorie pentru fiecare tulpină bacteriană, în vederea instituirii unui tratament corect.

Sensibilitatea bacteriilor față de antibiotice se testează "*in vitro*" punându-le în condiții optime şi standardizate de cultivare (mediul de cultură, inocul, timp de incubare etc.) în prezența unor cantități descrescânde de antibiotic.

După modalitățile tehnice de realizare se deosebesc două metode de testare a acestei sensibilități:

- ✓ metoda difuzimetrică;
- ✓ metoda diluțiilor seriate.

14.1. METODA DIFUZIMETRICĂ KIRBY-BAUER

Tehnica Bauer adoptată de NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) din SUA este larg utilizată în majoritatea țărilor. Este metoda uzuală pentru laboratoarele care testează un număr relativ mic de tulpini bacteriene cu creştere rapidă, fără diferențe semnificative a ratei de creştere de la tulpină la tulpină.

Principiul metodei

Prin depunerea discurilor (microcomprimatelor) cu antibiotice pe suprafața unui mediu solid însămânțat cu o cultură bacteriană, substanța antimicrobiană activă va difuza în mediu, prezentând o scădere constantă a gradientului de concentrație de la marginea microcomprimatului spre periferie.

După un anumit timp de incubație se vor contura două zone distincte: una în care creşterea microbiană este inhibată de concentrații de substanță antimicrobiană şi o zonă de creştere, în care concentrația de antibiotic este prea mică pentru a inhiba creşterea.

Cu cât diametrul zonei de inhibiție este mai mare, cu atât germenele este mai sensibil, adică, cantitatea de antibiotic necesară inhibiției bacteriei testate (concentrația minimă inhibitorie = C.M.I.) este mai mică şi invers. Există deci o relație invers proporțională între diametrul zonei de inhibiție şi C.M.I. Aceasta se poate exprima grafic sub forma unei curbe de regresie pe o diagramă, cu ajutorul căreia se poate, cunoscând diametrul zonei de inhibiție, afla cu oarecare aproximație C.M.I.-ul respectiv.

Pentru tehnica Kirby-Bauer s-au putut măsura diametrele critice

care permit clasificarea germenilor studiați în "sensibili", "rezistenți" și "intermediari", în cazul unor infecții de gravitate medie și folosind antibiotice în doze medii.

Standardizarea condițiilor tehnice de lucru

Fiecare din componentele care concură la efectuarea antibiogramei pot influența diametrul zonei de inhibiție și deci criteriile de interpretare. Astfel, un mediu cu o concentrație mai mare de geloză va condiționa zone de inhibiție mai reduse și invers; un inocul prea bogat va determina un diametru de inhibiție mai redus și invers.

Condițiile tehnice referitoare la mediul de cultură (compoziție, pH), inocul, felul discurilor (microcomprimatelor), efectuarea testului, inocularea, trebuie precis standardizate.

Materiale necesare:

- plăci Petri cu agar Müeller-Hinton turnat în strat uniform de 4 mm grosime. Concentrația gelozei din mediu este de 1,5 – 1,7 %, pH-ul=7,2 – 7,4 măsurat înainte de turnarea în plăci (50^0 C). Acest mediu are o valoare nutritivă care permite dezvoltarea optimă a unei mari varietăți de germeni și nu conține inhibitori ai unor substanțe bacteriene;
- cultura bacteriană de cercetat și cultura martor de 18 ore. Este necesar ca inoculul din germenele de cercetat să fie reprezentativ, adică să cuprindă toate categoriile populațiilor microbiene, uneori heterogenă din punct de vedere al rezistenței. Pentru prepararea inoculului se va pleca de la 4-6 colonii identice, dezvoltate pe un mediu neselectiv;
- etalonul 0,5 din scara McFarland cu sulfat de bariu;
- tampoane de vată pe tijă de lemn;
- trusă cu discuri de antibiotice, comercializată;
- pensă sau repartitor automat de discuri;
- riglă gradată.

Tehnica de lucru:

- se însămânțează într-un tub cu bulion nutritiv cca. 5 colonii bine individualizate, reprezentative pentru bacteria testată; se ajustează turbiditatea corespunzătoare etalonului 0,5 McFarland; din momentul etalonării plăcile trebuie inoculate în minimum 15 minute;
- se procedează identic cu tulpina de referință (martor);
- se aduc discurile de antibiotice la temperatura camerei;

- se usucă suprafața agarului Müeller-Hinton (20-30 minute) la 37^0 C cu placa întredeschisă;
- se însămânțează plăcile; tamponul de vată se imersează în suspensia bacteriană etalonată; se scurge excesul de lichid prin rotirea tamponului de pereții eprubetei; se descarcă apoi tamponul în striuri paralele pe suprafața mediului, succesiv în trei direcții prin rotirea plăcii cu câte 60^0; în final cu vârful tamponului se parcurge circumferința plăcii; în acest fel inoculul este dispersat uniform;
- se lasă placa 3-5 minute, niciodată mai mult de 15 minute, pentru adsorbția inoculului;
- se depun discurile de antibiotic la distanță de 15 mm de marginea plăcii și 30 mm între centrele a două discuri vecine folosind o pensă sau un aparat automat de repartizare; ideal antibioticele se grupează pe familii;
- se incubează plăcile cu capacul în jos în funcție de bacterie (35^0 C pentru stafilococ, 37^0 C pentru restul bacteriilor); durata incubării este de 16-18 ore; este contraindicată așezarea a mai mult de două plăci una peste alta.

Citirea și exprimarea rezultatelor:

Se supun citirii numai plăcile care prezintă o cultură corespunzătoare din punct de vedere al purității și densității. Citirea se face cu ochiul liber, măsurând diametrul zonei de inhibiție în mm, de 2-3 ori în diferite direcții, cu ajutorul unei rigle gradate (Fig. 90).

Exprimarea rezultatelor se face prin transcripția directă a diametrului zonei de inhibiție în categorii de tulpini sensibile, rezistente sau intermediare (Tabelele VIII, IX).

14.2. METODA DILUȚIILOR SERIATE (DETERMINAREA C.M.I.)

Materiale necesare:

- eprubete sterile;
- pipete gradate sterile;
- mediu de cultură (bulion simplu, mediu Müeller-Hinton lichid);
- cultura în bulion de 18-20 ore a tulpinii de cercetat.

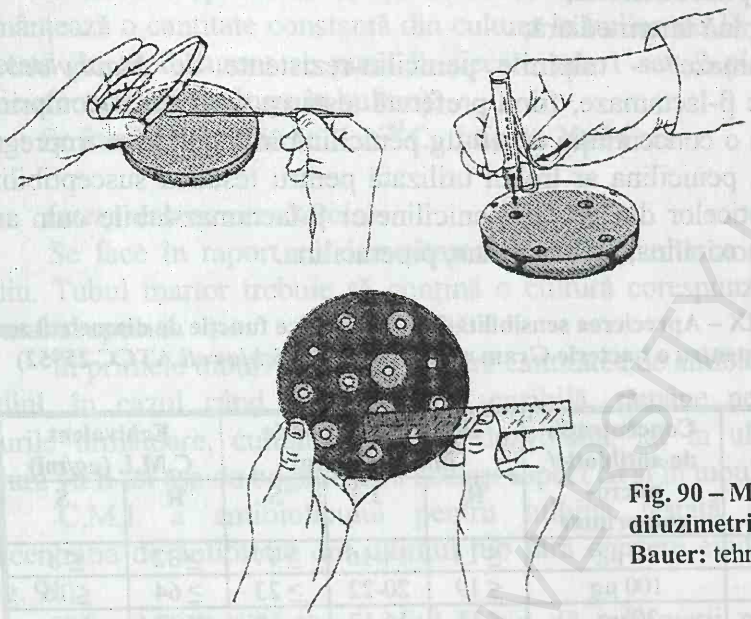


Fig. 90 – Metoda difuzimetrică Kirby-Bauer: tehnica de lucru

Tabel VIII – Aprecierea sensibilității la antibiotice funcție de diametrul zonei de inhibiție pentru o bacterie Gram pozitivă (*Staphylococcus* sp.)

Antibioticul	Concentrația de antibiotic/ micro-comprimat	Diametrul zonei de inhibiție (mm)			Echivalent C.M.I. (µg/ml)	
		R	I	S	R	S
Penicilină	10 unit	≤ 28	-	≥ 29	β lactamaze*	≤ 0,1
Oxacilină	1 µg	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
Ampicilină	10 µg	≤ 28	-	≥ 29	β lactamaze*	≤ 0,25
Meticilină	5 µg	≤ 9	10-13	≥ 14	≥ 16	≤ 8
Amoxicilină	20 µg	≤ 19	-	≥ 20	≥ 8	≤ 4
Cefalotin	30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Vancomicină	30 µg	-	-	≥ 15	≥ 32	≤ 4
Gentamicină	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Kanamicină	30 µg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 25	≤ 6
Tobramicină	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Eritromicină	15 µg	≤ 13	14-22	≥ 23	≥ 8	≤ 0,5
Tetraciclină	30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
Doxicilină	30 µg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Ciprofloxacin	5 µg	≤ 15	16-20	≥ 21	≥ 4	≤ 1
Nitrofurantoin	300 µg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 128	≤ 32
Cloramfenicol	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Rifampicină	5 µg	≤ 13	17-19	≥ 20	≥ 4	≤ 1

R – tulpină rezistentă;

S – tulpină sensibilă;

I – tulpină intermediară;

β-lactamaze* - tulpinile penicilin-rezistente de *Staphylococcus aureus* produc β-lactamaze, fiind preferată testarea unor microcomprimate impregnate cu o concentrație de 10 μg penicilină în locul celor impregnate cu ampicilină; penicilina ar trebui utilizată pentru testarea susceptibilității tuturor antibioticelor din grupul penicilinelor β-lactamaz-labile cum ar fi: ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, piperacilina.

Tabel IX – Aprecierea sensibilității la antibiotice funcție de diametrul zonei de inhibiție pentru o bacterie Gram negativă (*Escherichia coli* ATCC 25952)

Antibioticul	Concentrația de antibiotic/ micro-comprimat	Diametrul zonei de inhibiție (mm)			Echivalent C.M.I. (μg/ml)	
		R	I	S	R	S
Ampicilină	10 μg	≤ 13	14-16	≥ 17	≥ 32	≤ 8
Carbenicilină	100 μg	≤ 19	20-22	≥ 23	≥ 64	≤ 16
Amoxicilină	20 μg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Cefalotin	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Gentamicină	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Kanamicină	30 μg	≤ 13	14-17	≥ 18	≥ 25	≤ 16
Tobramicină	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15	≥ 8	≤ 4
Streptomicină	10 μg	≤ 11	12-14	≥ 15	-	-
Tetraciclină	30 μg	≤ 14	15-18	≥ 19	≥ 16	≤ 4
Doxicilină	30 μg	≤ 12	13-15	≥ 16	≥ 16	≤ 4
Acid nalidixic	30 μg	≤ 13	14-18	≥ 19	≥ 32	≤ 8
Cloramfenicol	30 μg	≤ 12	13-17	≥ 18	≥ 32	≤ 8
Nitrofurantoin	300 μg	≤ 14	15-16	≥ 17	≥ 128	≤ 32

Tehnica de lucru:

Se repartizează în eprubete sterile mediul de cultură în care se efectuează diluții succesive de antibiotic, în așa fel încât să se obțină în fiecare tub o concentrație precisă de antibiotic/ml.

Diluțiile trebuie să meargă de la cea mai mare concentrație a antibioticului posibilă de obținut în sânge, până la o concentrație inferioară C.M.I. a tulpinii martor.

Exemplu: penicilina se diluează, de obicei, în așa fel încât să se obțină următoarele concentrații de antibiotic/ml: 100 U.I.; 10 U.I.; 1 U.I.; 0,1, U.I.; 0,01 U.I.; 0,001 U.I.

Streptomicina și aureomicina se diluează astfel încât să existe la 1 ml mediu de cultură următoarele cantități: 100 μg; 10 μg; 1 μg; 01 μg; 0,01

µg şi 0,001 µg.

În fiecare eprubetă, ca şi în tubul martor (fără antibiotic) se însămânțează o cantitate constantă din cultura în bulion de 18 ore a tulpinii cercetate (în mod curent se pune în fiecare tub 1 sau 2 picături dintr-o diluție efectuată din cultura în bulion).

Se incubează tuburile la 37^0 C, timp de 20-24 ore.

Interpretarea rezultatelor:

Se face în raport cu dezvoltarea sau nedezvoltarea germenilor în mediu. Tubul martor trebuie să conțină o cultură corespunzătoare tipului cultural al speciei.

În primele tuburi din serie, în care cantitatea de antibiotic este mare, mediul, în cazul când bacteria este sensibilă, rămâne nemodificat. În tuburile următoare, cultura este slab dezvoltată, iar în ultimele tuburi, cultura va fi tot aşa de bogată şi cu acelaşi aspect ca şi în tubul martor.

C.M.I. a antibioticului pentru tulpina testată este dată de concentrația de antibiotic din ultimul tub fără creştere evidentă a culturii (Fig. 91).

Metoda diluțiilor în mediul lichid dă informații precise privind C.M.I. a antibioticului. Este însă laborioasă şi costisitoare.

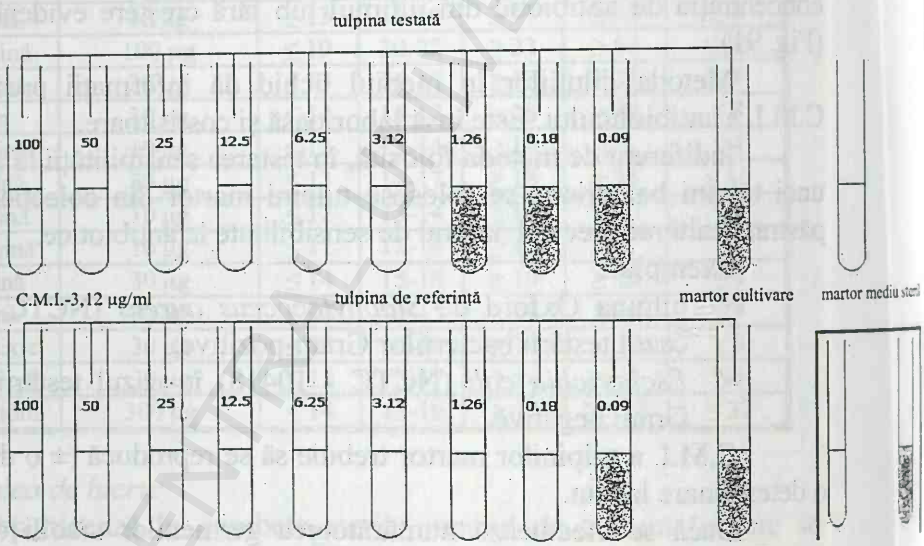
Indiferent de metoda folosită, în testarea sensibilității la antibiotice a unei tulpini bacteriene se folosesc tulpini martor din colecție, care şi-au păstrat nealterat spectrul natural de sensibilitate la antibiotice.

Exemplu:

- ✓ tulpina Oxford de *Staphylococcus aureus* (NCTC - 6571) în cazul testării bacteriilor Gram-pozitive;
- ✓ *Escherichia coli* (NCTC - 10418) în cazul testării bacteriilor Gram negative.

C.M.I. a tulpinilor martor trebuie să se reproducă (± o diluție) de la o determinare la alta.

Dacă se efectuează numărătoarea germenilor viabili din tuburile fără cultivare evidentă, se poate determina **concentrația minimă bactericidă (C.M.B.)** definită ca, cea mai mică concentrație de antibiotic care distruge în proporție de 99,9 - 100% bacteria din inoculul inițial.



BCU IASI OPEN ACCESS UNIVERSITY LIBRARY

15. DETERMINAREA NUMĂRULUI DE MICROORGANISME DIN DIFERITE MEDII NATURALE

Solul, apa, alimentele ş.a. sunt populate de o variată floră microbiană. Analiza microbiologică a unor astfel de surse implică o gamă largă de medii de cultură adecvate fiecărui tip de microorganism.

Una din metodele de rutină folosite pentru **determinarea numărului de microorganisme din diferite surse este metoda culturilor în plăci.** Această metodă foloseşte numărarea coloniilor dezvoltate în urma însămânţării pe medii agarizate, în plăci Petri, a diluţiilor obţinute din proba supusă analizei.

Această tehnică se bazează pe faptul că fiecare celulă viabilă dezvoltă o colonie şi deci numărul de colonii de pe placa Petri indică numărul de microorganisme conţinute în probă, capabile să crească în condiţiile oferite de mediul de cultură folosit.

Tehnica de lucru cuprinde următoarele etape:

1. *efectuarea diluţiilor* – proba de analizat este diluată în scopul obţinerii pe o placă Petri a unui număr de 50-300 colonii; în acest scop se realizează serii de diluţii zecimale (Fig. 92);
2. *însămânţarea* – din diluţiile efectuate se fac însămânţări în plăcile Petri, introducând câte 1 ml din fiecare diluţie într-o placă cu mediu topit şi răcit la 45^0 C; plăcile se rotesc uşor pentru distribuirea uniformă a inoculului în mediu; pentru fiecare diluţie se recomandă să se însămânţeze câte 2-3 plăci, făcându-se apoi media coloniilor dezvoltate;
3. *incubarea* – plăcile însămânţate se pun la termostat la temperatura adecvată: 37^0 C pentru bacterii şi 28^0 C pentru ciuperci şi actinomicete;
4. *numărarea coloniilor* – coloniile de bacterii se numără obişnuit după 24-48 ore, cele de ciuperci după 5-7 zile iar cele de actinomicete după 7-14 zile de incubare la termostat; coloniile se numără cu ochiul liber sau cu ajutorul lupei.

În cazul unui număr mare de colonii dezvoltate, numărătoarea se face cu ajutorul unor plăci prevăzute cu o reţea de pătrate gravată în sticlă; dintre plăcile mai frecvent utilizate menţionăm plăcile Wolfhugel şi Lafar; placa Wolfhugel este împărţită în 144 suprafeţe de 1 cm^2.

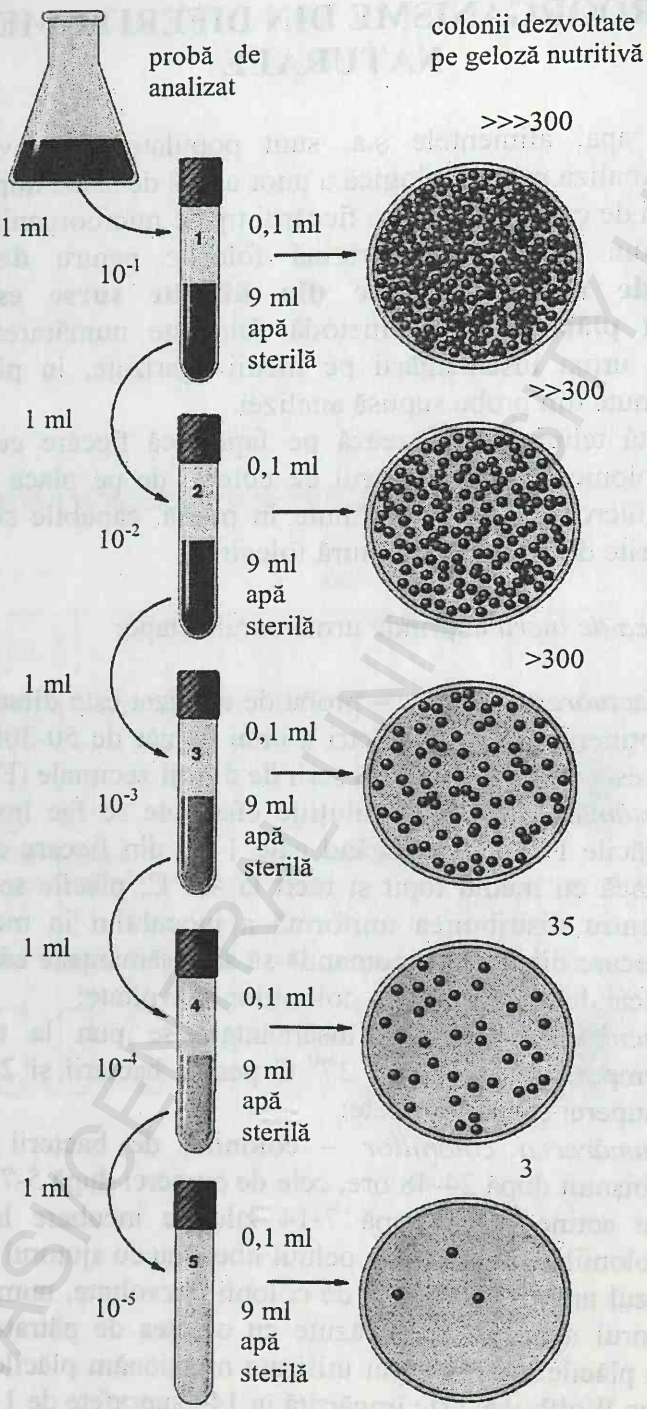


Fig. 92 – Tehnica executării diluțiilor seriate zecimale (după Lim, 1999)

Placa Lafar este rotundă şi cuprinde 6 sectoare, fiecare subdivizat în 10 suprafeţe de 1 cm^2 (Fig. 93); una din aceste plăci se aşază sub cutia Petri şi se numără coloniile din 10-20 suprafeţe de 1 cm^2; apoi se face media pentru 1 cm^2; pentru aflarea numărului total de colonii din placă se înmulţeşte numărul aflat pe 1 cm^2 cu suprafaţa plăcii.

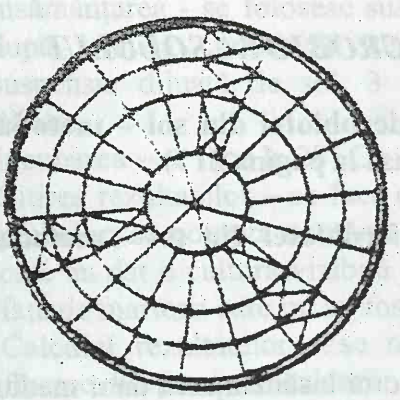


Fig. 93 – Placa Lafar

Pentru operativitate se folosesc aparate speciale de tipul numărătorului de colonii „titriplaque".

Cea mai bună diluţie este cea din care se dezvoltă un număr de 50-100 colonii. Dacă numărul coloniilor crescute în cazul însămânţării unei diluţii este mai mic de 10 sau mai mare de 300, atunci aceste rezultate nu se iau în considerare.

Numărul de germeni dintr-un ml produs iniţial examinat se calculează după formula:

$$UFC / ml = \frac{a \, x \, 10^n}{V}$$

în care:

UFC = unităţi formatoare de colonii;

a = numărul mediu al coloniilor dezvoltate după însămânţare;

10 = coeficient de diluţie;

n = numărul de ordine al diluţiei cu care s-a făcut însămânţarea (luat cu semn schimbat);

V = volumul (în ml) de suspensie folosită la însămânţare.

Avantajul acestei metode constă în simplitatea ei şi în faptul că nu necesită aparatură complexă. Dezavantajul ei rezultă din faptul că în cazul microorganismelor care formează lanţuri sau alte grupări caracteristice (ciorchine, tetrade etc.) uneori se formează, după însămânţare, numai o singură colonie, iar la numărătoare se obţine un număr mai mic de microorganisme decât în realitate.

15.1. MICROBIOTA SOLULUI

15.1.1. Determinarea microbiotei din sol – metoda pe mediu solid (tehnica de lucru este descrisă la pagina 217).

15.1.2. Determinarea microbiotei din sol – metoda în mediu lichid

Principiul metodei:

Toate tehnicile care comportă însămânţarea unui mediu lichid, cu un volum măsurat dintr-o suspensie diluată de sol îşi propun să estimeze şi să raporteze la un gram de sol numărul cel mai probabil de germeni viabili şi capabili să se multiplice în acest mediu.

Mediul de cultură:

extract de sol	750 ml
extract de levuri	0,75 g
apă distilată	350 ml

pH = 7,2. Sterilizarea se face la 1 atm, timp de 20 minute.

Mediul se repartizează în eprubete (câte 5 ml).

Prepararea extractului de sol

Se ia o cantitate de sol de grădină, productiv şi cu o bună stare pedologică care se amestecă cu o cantitate egală de apă de robinet.

Se ţine amestecul la autoclav o oră la 121^0 C, apoi se lasă să iasă vaporii foarte încet, până când temperatura scade la 100^0 C. Între timp se pregăteşte o baterie de flacoane prevăzute cu pâlnii şi hârtii de filtru, prin care se filtrează extractul. Lichidul de filtrare se trece succesiv, prin mai multe filtre, în aceeaşi ordine, pentru a obţine un lichid limpede, de culoarea chihlimbarului, schimbând hârtia de filtru ori de câte ori este nevoie.

Extractului obținut i se verifică pH-ul, care trebuie să fie neutru, apoi se repartizează în flacoane şi se sterilizează la autoclav (115^0 C, timp de 30 minute).

Tehnica de lucru:

- Efectuarea suspensiilor-diluții de sol.
- Însămânțarea - se folosesc suspensiile diluate de sol obținute după tehnica cunoscută; se însămânțează cu câte 1 ml suspensie diluată de sol, 3 sau 5 eprubete pentru aceeaşi diluție.
- Incubarea – se face la 28^0 C.
- Citirea rezultatelor – se face după 3, 5, 7 zile de la incubarea probelor; se notează numărul de tuburi pozitive, adică a celor care au dat o cultură vizibilă (tulbureală); rezultatele se citesc față de martorii care nu au fost însămânțați cu diluții de sol.
- Calculul rezultatelor - se numără tuburile pozitive pentru fiecare diluție, se calculează:

1. **Numărul caracteristic.**
2. **Numărul de germeni/g sol.**

Rezultatele sunt exprimate în număr de microorganisme/g de sol după tabelele lui McCrady (pentru 3 şi 5 tuburi de diluție) şi apoi în logaritm în baza 2 din numărul de microorganisme/g de sol. Pe baza acestor rezultate se pot trasa curbele de creştere.

Exemplu:

Probă	Diluție					
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
I	+++	+++	++-	---	---	---
II	+++	+++	+++	+--	+--	---

1. Stabilirea numărului caracteristic (N):

Numărul caracteristic este format din 3 cifre, fiecare cifră reprezentând numărul de reacții pozitive pentru fiecare diluție, citirea făcându-se începând cu ultima diluție la care toate reacțiile au fost pozitive.

Exemplu:

Numărul caracteristic pentru proba de sol I este **320** pentru diluția 10^{-6} (pentru că diluția 10^{-6} este ultima diluție la care toate tuburile au dat reacții pozitive).

Numărul caracteristic pentru proba de sol II este **311** pentru diluția 10^{-7} (pentru că diluția 10^{-7} este ultima diluție la care toate tuburile au dat reacții pozitive).

2. Din tabelul lui McCrady (Tabel X) se citeşte numărul de microorganisme care corespunde fiecărui număr caracteristic aflat:

I = 320 → 9,5

II = 311 → 7,5

Tabel X – Corelația dintre numărul caracteristic şi numărul de microorganisme propusă de McCrady (pentru 3 tuburi de diluție)

Număr caracteristic	Număr microorganisme	Număr caracteristic	Număr microorganisme
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
120	1,1	312	11,5
121	1,5	313	16,0
130	1,6	320	9,5
200	0,9	321	15,0
201	1,4	322	20,0
202	2,0	323	30,0
210	1,5	330	23,0
211	2,0	331	45,0
212	3,0	332	110,0
220	2,0	333	140,0
221	3,0		

Corespondentul numărului de microorganisme găsit se va înmulți cu diluția respectivă:

I → 9,5 x 10^6 = 9.500.000 microorganisme/g de sol

II → 7,5 x 10^7 = 75.000.000 microorganisme/g de sol

3. Pentru a se putea înscrie în grafice (curbă), din aceste numere se calculează logaritm în baza 2 astfel:

- se iau primele 3 cifre ale numărului de microorganisme şi restul devin puterea lui 10:

I → **950***0000* → 950 + 10^4

II → 750<u>00000</u> → $750 + 10^5$

- se caută apoi în tabelele cu logaritmi:

I → $\log_2 950 = 9,892$; $\log_2 10^4 = 13,288$

$\log_2$ nr. de microorganisme = 9,892 + 13,288 = 23,18

II → $\log_2 750 = 9,551$; $\log_2 10^5 = 16,610$

$\log_2$ nr. de microorganisme = 9,551 + 16,610 = 26,161

15.2. MICROBIOTA APEI

Apele naturale conțin o largă varietate de microorganisme. Analiza unei probe de apă pe un singur mediu de cultură permite evidențierea numai a unei mici părți din populația microbiană totală. De aceea, atât mediile nutritive cât și procedeele de izolare sunt diferențiate.

Majoritatea bolilor transmise prin apă au ca agenți etiologici microorganisme eliminate prin tubul digestiv. De aici, rezultă că prima și cea mai importantă condiție bacteriologică de potabilitate a apei este absența în apă a enterobacteriilor patogene. Punerea în evidență a acestora în apă este destul de dificilă datorită, pe de o parte metodelor mai complicate, iar pe de altă parte, inconstanței prezenței lor în apă. Există însă câteva condiții pe care trebuie să le îndeplinească acești indicatori ai poluării fecale a apei și anume:

- să fie prezenți constant și în cantitate mare în materiile fecale ale omului și animalelor cu sânge cald;
- să fie absenți sau puțin numeroși în mediul exterior sau în alte surse;
- să fie ușor de izolat, identificat și numărat prin examene bacteriologice simple și rapide;
- să permită stabilirea unei relații cantitative între numărul lor și nivelul de poluare al apei;
- să fie incapabili să se multiplice în apă;
- să supraviețuiască în apă timp mai îndelungat decât microorganismele patogene și să reziste un timp cât mai apropiat de cel al patogenilor.

Probele de apă pentru analiză se recoltează și se transportă cu anumite precauții. Cantitatea de apă necesară variază de la 500 cm^3, pentru analizele curente, până la 100 dm^3 pentru analizele complementare. Transportul se face în lăzi compartimentate, refrigerate sau cu agenți frigorifici. În funcție de distanță, în special în anotimpul cald, probele se transportă mai ușor, în genți frigorifice, astfel ca temperatura să nu depășească + 4^0 C. Dacă probele de apă recoltate nu

pot fi aduse în laborator în timp util, datorită unor distanțe prea mari care trebuie parcurse, se păstrează la frigider maxim 24 ore. În cazul în care apa de analizat este clorinată, înainte de sterilizarea buteliei pentru recoltarea probei se introduce în aceasta 1 ml soluție de tiosulfat de sodiu 0,5 % pentru 100 ml probă de apă ce urmează a fi recoltată. Soluția de tiosulfat va fi sterilizată în prealabil la 100^0 C, câte 20 minute timp de 3 zile consecutiv.

Buteliile cu probele de apă se prevăd cu etichete pe care se înscriu datele necesare identificării probei:

- numărul probei sau lotului;
- denumirea punctului de recoltare;
- data, ora recoltării şi eventualele caracteristici ale locului de recoltare.

Analiza bacteriologică a apei are drept scop aprecierea caracterului de potabilitate a apei. Rezultatele acestei analize se corelează cu cele ale determinărilor organoleptice, fizice, chimice şi biologice, în vederea aprecierii complexe a potabilității apei.

Pentru analiza bacteriologică a apei (conform STAS-ului 3001-91) se folosesc următoarele metode:

- *metode de analiză curentă*;
- *metode de analiză complementară.*

15.2.1. Metode de analiză curentă

Aceste metode sunt obligatorii şi se aplică la supravegherea calității apei distribuite populației. Prin aceste metode se determină:

- numărul total de bacterii mezofile aerobe la 37^0 C (mezofile);
- numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali);
- numărul probabil de bacterii coliforme termotolerante (coliformi fecali);
- numărul probabil de streptococi fecali.

Determinarea numărului total de bacterii care se dezvoltă la 37^0 C (mezofile)

Bacteriile mezofile sunt microorganisme care se dezvoltă la 22^0 C şi la 37^0 C, capabile să formeze colonii vizibile pe medii nutritive, în anumite condiții de cultură.

Principiul metodei:

Prezența bacteriilor mezofile se pune în evidență prin însămânțarea probei sau diluțiilor decimale prin procedeul încorporării într-un mediu nutritiv solid incubat la 37^0 C timp de 48 ore, urmat de numărarea coloniilor dezvoltate. Rezultatul se exprimă prin numărul de unități formatoare de colonii (UFC) pe cm^3.

Materiale necesare:

- eprubete de 16 x 160 mm, sterile;
- lupă cu capacitate de mărire 2x-4x;
- cutii Petri cu diametrul de 10 cm, sterile;
- pipete gradate de 1 ml sterile;
- termostat care asigură temperatura de 37^0 C;
- apă tamponată sterilă de lucru:

soluție de rezervă: într-un balon cotat de 1000 cm^3 se dizolvă 34 g dihidrogenofosfat de potasiu (KH_2PO_4) în 500 cm^3 de apă; se ajustează pH-ul la 7,2 cu soluție de hidroxid de sodiu, se completează la semn cu apă și se omogenizează;

soluție de lucru: într-un balon cotat de 1000 cm^3 se introduc 1,25 cm^3 din soluția de rezervă, se completează la semn cu apă, se omogenizează și se sterilizează la 121^0 C, timp de 20 minute.

- mediu de cultură: geloză nutritivă.

Tehnica de lucru:

Însămânțarea – din proba omogenizată prin mișcări de rotire ale flaconului în plan orizontal, în ambele sensuri, se ia cu o pipetă un volum de 1 ml și se introduce într-o cutie Petri; în cazul probelor cu un număr mare de bacterii este necesar să se însămânțeze și probele diluate 10^{-1} și 10^{-2}; în fiecare cutie Petri cu proba nediluată sau diluată se introduc 10-15 ml mediu geloză nutritivă, topită și răcită la 45^0 C; se omogenizează conținutul plăcilor Petri prin mișcări de rotație în plan orizontal, în ambele sensuri, după care se lasă să se solidifice geloza. Pe capacele plăcilor Petri se notează numărul probei, diluția, data și temperatura de incubare.

Efectuarea diluțiilor – într-o eprubetă care conține 9 cm^3 apă tamponată sterilă, soluție de lucru, se introduce 1 cm^3 probă cu pipeta de 1 ml; cu o altă pipetă se omogenizează conținutul; se obține diluția 10^{-1}; cu aceeași pipetă cu care s-a omogenizat conținutul, se trece 1 cm^3 într-o altă eprubetă care conține 9 cm^3 apă tamponată sterilă, soluție de lucru; cu o altă pipetă de 1 ml se omogenizează conținutul, realizându-se astfel

diluția 10^{-2}, în același mod se procedează pentru obținerea unor diluții mai mari.

Incubarea – cutiile Petri însămânțate se așază cu capacul în jos în termostat și se incubează la 37^0 C, timp de 48 ore.

Calculul rezultatelor – se numără coloniile care s-au dezvoltat atât la suprafața cât și în interiorul gelozei, cu ochiul liber sau cu lupa; cutiile Petri care conțin peste 300 colonii nu se iau în considerare și se elimină; când nu se folosesc diluții, rezultatul se exprimă prin numărul coloniilor ce s-au dezvoltat raportându-se la volumul de 1 cm^3 care a fost însămânțat din proba luată în lucru; dacă s-au folosit diluții, calculul numărului de bacterii raportat la 1 ml apă se face cu formula:

$$UFC/\ cm^3 = \frac{\sum (n \times d)}{N \times V}$$

în care:

UFC = unități formatoare de colonii;
n = numărul de colonii ce s-a dezvoltat într-o cutie Petri;
d = inversul diluției probei însămânțate;
N = numărul de cutii Petri luate în calcul;
V = volumul probei luate în lucru (în ml).

Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme (coliformi totali)

Metoda tuburilor multiple

Bacteriile coliforme (coliformi totali) sunt bacili mobili, Gram negativi, nesporulați, care fermentează lactoza la 37^0 C ± $0,5^0$ C. Se decelează prin producerea de acid și gaz în bulion-lactoză și se identifică prin aspectul caracteristic al coloniilor formate pe medii selective.

Principiul metodei

Prezența bacteriilor coliforme (coliformi totali) se pune în evidență prin testul de prezumție, însămânțând apă sau/și diluții decimale într-un număr de flacoane și eprubete cu mediu de îmbogățire lichid, reacția pozitivă fiind evidențiată printr-un test de confirmare pe mediu solid, la temperatura de 37^0 C ± $0,5^0$ C, după 24 ore. Plecând de la

numărul de tuburi confirmate se calculează numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali).

Materiale necesare:

- ansă bacteriologică;
- eprubete de 16 x 160 mm cu tuburi de fermentare Durham în interior, sterile;
- cutii Petri cu diametrul de 10 cm, sterile;
- termostat care asigură temperatura de 37^0 C ± $0,5^0$ C;
- apă tamponată sterilă, soluție de lucru;
- mediu bulion-lauryl sulfat cu următoarea compoziție:

peptonă tripticar	20 g
Na_2HPO_4	2,75 g
$Na_2H_2PO_4$	2,75 g
NaCl	5 g
lactoză	5 g
lauryl sulfat de sodiu	0,1 g
apă distilată	1000 ml

pH = 6,8. Sterilizare la 115^0 C, timp de 20 minute.

- mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat cu următoarea compoziție:

peptonă tripticar	40 g
Na_2HPO_4	5,50 g
$Na_2H_2PO_4$	5,50 g
NaCl	10 g
lactoză	10 g
lauryl sulfat de sodiu	0,2 g
apă distilată	1000 ml

pH = 6,8. Sterilizare la 115^0 C, timp de 20 minute.

- mediu geloză-lactoză-eozină-albastru de metilen (GEAM) – Cap. 3, Medii de cultură.

Tehnica de lucru:

➢ **Testul de prezumție**

Pentru apa recoltată din instalațiile centrale (rezervor şi rețea de distribuție) se analizează un volum de 100 cm^3 probă, din care se însămânțează 50 cm^3 probă într-un flacon care conține 50 cm^3 mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat şi câte 10 cm^3 probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 cm^3 mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat.

Pentru apa recoltată din surse locale (fântâni, izvoare) sau alte categorii de ape decât cele potabile, se analizează un volum de 55,5 cm^3 probă din care se însămânțează câte 10 cm^3 probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 cm^3 mediu bulion-lauryl sulfat dublu concentrat, câte 1 cm^3 probă în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 cm^3 mediu bulion-lauryl sulfat şi câte 1 cm^3 din diluția 10^{-1} a probei, în 5 eprubete care conțin fiecare câte 10 cm^3 mediu bulion-lauryl sulfat (Fig. 94).

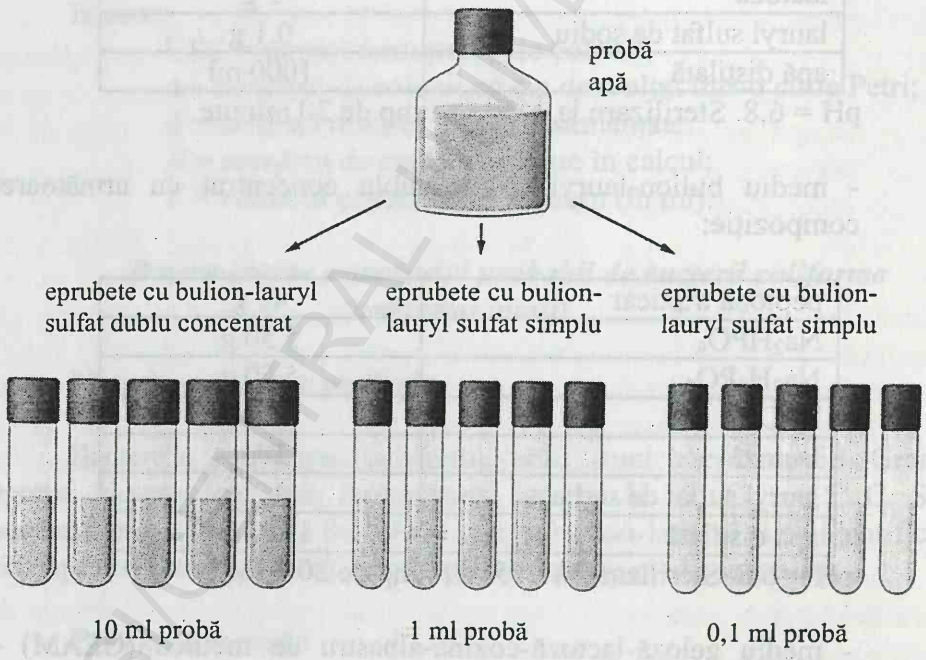


Fig. 94 – Tehnica estimării numărului probabil de bacterii coliforme

În cazul în care apa este poluată sau nu i se cunoaşte gradul de poluare se va însămânța în continuare în acelaşi mod din diluțiile 10^{-2},

10^{-3} etc. Flacoanele şi eprubetele însămânţate se introduc în termostat şi se incubează la 37^0 C ± $0,5^0$ C, timp de 48 ore.

După 24 ore se face o primă citire şi trecere pe mediu geloză-lactoză-eozină-albastru de metilen pentru testul de confirmare din flacoanele şi eprubetele unde se constată turbiditate şi gaz. Se consideră pozitive flacoanele şi eprubetele în care se evidenţiază fermentarea lactozei prin prezenţa de gaz în tuburile de fermentare oricât de mică ar fi cantitatea de gaz degajată în eprubetele respective. În continuare, eprubetele se menţin în termostat până la 48 ore. După 48 ore se face citirea definitivă şi treceri pentru testul de confirmare, pentru flacoanele şi eprubetele în care s-a obţinut o dezvoltare microbiană (turbiditate) cu sau fără gaz, cu excepţia celor care s-au confirmat la 24 ore.

➢ **Testul de confirmare**

Pentru a preciza dacă fermentarea a fost produsă de bacteriile coliforme, din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive la testul de prezumţie se fac însămânţări cu ansa pe mediul geloză-lactoză-eozină-albastru de metilen. Se fac dispersii cu ansa în striuri pe sectoare pentru obţinerea de colonii izolate. Pe o cutie Petri se folosesc cel mult 5 sau 6 sectoare în cazul trecerilor din eprubete şi 2-4 sectoare în cazul trecerilor din flacoane. Se incubează cutiile la termostat cu capacul în jos la 37^0 C ± $0,5^0$ C, timp de 24 ore. Prezenţa bacteriilor coliforme (coliformi totali) se confirmă dacă s-au dezvoltat colonii caracteristice: colonii plate de culoare albastru-violet închis, cu luciu metalic sau bombate, opace, mucoase cu luciu metalic în centru sau de culoare roz cu centrul albastru-violet.

Calculul rezultatelor:

Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme în 100 cm^3 probă se face cu ajutorul valorilor din tabelele XI, XII, în funcţie de cantitatea de probă analizată, luând în considerare flacoanele şi eprubetele confirmate.

Calculul numărului probabil de bacterii coliforme în 100 cm^3 probă din instalaţii centrale se face utilizând valorile din tabelul XI.

Exemplu:

Cantităţi de probă însămânţate: un volum de 50 cm^3 şi 5 volume de câte 10 cm^3. S-au confirmat 2 eprubete cu câte 10 cm^3 probă.

Rezultatul: 2 bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 cm^3 probă.

Calculul numărului probabil de bacterii coliforme în 100 cm^3 probă din surse locale şi alte categorii de apă decât cele potabile se face utilizând valorile din tabelul XII.

Exemplu:

Cantităţi de probă însămânţate: 5 volume de câte 10 cm^3, 5 volume de câte 1 cm^3 şi 5 volume de câte 1 cm^3 din diluţia 10^{-1}. S-au confirmat 5 eprubete cu câte 10 cm^3 probă, 3 eprubete cu câte 1 ml şi o eprubetă cu 1 cm^3 din diluţia 10^{-1}.

Rezultatul: un număr probabil de 109 bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 cm^3 probă.

În cazul în care s-au însămânţat diluţii de probă mai mari de 10^{-1}, pentru citirea tabelului XII se ia în considerare seria de 3 diluţii succesive (cu gradul de diluţie cel mai mare) astfel aleasă, încât prima diluţie din această serie să fie total sau parţial pozitivă şi precedată numai de serii total pozitive. Numărul probabil de bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 cm^3 probă se obţine prin adăugarea la valoarea citită în tabel pentru seria de diluţii luată în calcul, a unui număr de zerouri egal cu diferenţa dintre prima diluţie luată în calcul şi volumul însămânţat iniţial.

Exemplu:

S-au confirmat 5 eprubete din diluţia 10^{-1}, 3 eprubete din diluţia 10^{-2} şi o eprubetă din diluţia 10^{-3}.

Rezultatul: un număr probabil de 10.900 bacterii coliforme (coliformi totali) în 100 cm^3 probă.

Tabel XI – Numărul probabil de bacterii coliforme/100 cm^3 probă apă din instalaţii centrale

Numărul flacoanelor sau eprubetelor pozitive din:		Numărul probabil de indicator bacteriologic în 100 cm^3 probă
Flacon cu 50 cm^3 probă	5 eprubete cu 10 cm^3 probă	
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	peste 16

Tabel XII – Numărul probabil de bacterii coliforme/100 cm^3 probă din surse locale şi alte categorii de apă decât cele potabile

Numărul eprubetelor pozitive din:			Număr probabil de indicator bacterio-logic/100 cm^3 probă	Numărul eprubetelor pozitive din:			Număr probabil de indicator bacterio-logic/100 cm^3 probă
5 epru-bete cu 10 cm^3 probă	5 epru-bete cu 1 cm^3 probă	5 epru-bete cu 1 cm^3 probă diluţia 10^{-1}		5 epru-bete cu 10 cm^3 probă	5 epru-bete cu 1 cm^3 probă	5 epru-bete cu 1 cm^3 probă diluţia 10^{-1}	
0	0	0	sub 2	4	2	1	26
0	0	1	2	4	3	0	27
0	1	0	2	4	3	1	33
0	2	0	4	4	4	0	34
1	0	0	2	5	6	0	23
1	0	1	4	5	0	1	31
1	1	0	4	5	0	2	43
1	1	1	6	5	1	0	33
1	2	0	6	5	1	1	46
2	0	0	5	5	1	2	63
2	0	1	7	5	2	0	49
2	1	0	7	5	2	1	70
2	1	1	9	5	2	2	94
2	2	0	9	5	3	0	79
2	3	0	12	5	3	1	109
3	0	0	8	5	3	2	141
3	0	1	11	5	3	3	175
3	1	0	11	5	4	0	130
3	1	1	14	5	4	1	172
3	2	0	14	5	4	2	221
3	2	1	17	5	4	3	278
3	3	0	17	5	4	4	345
4	0	0	13	5	5	0	240
4	0	1	17	5	5	1	348
4	1	0	17	5	5	2	542
4	1	2	26	5	5	4	1609
4	2	0	22	5	5	5	peste 1609

Metoda membranei filtrante (metoda rapidă)

Metoda se aplică în următoarele cazuri:

- când trebuie determinat rapid numărul de bacterii coliforme;

- pentru economie de timp şi materiale, în cazul unui număr mare de probe;
- când transportul probelor la laborator durează mult timp şi este necesară însămânţarea probelor la locul de recoltare.

Metoda poate fi aplicată probelor care conţin o cantitate mare de suspensii sau turbiditate mare (alge, mâl).

Materiale necesare:

- autoclav;
- capsulă de porţelan;
- cilindri gradaţi de 50 şi 100 cm^3, sterili;
- dispozitiv de filtrare sub vid, cu suport pentru filtru cu diametru de 30-40 nm (în funcţie de model);
- etuvă termoreglabilă;
- lupă cu grosismentul 2x-4x;
- membrane filtrante cu diametrul de 30-45 nm şi mărimea porilor de 0,45-0,70 μm;
- pensă fără dinţi;
- cutii Petri cu diametrul de 10 cm, sterile;
- rondele de hârtie de filtru cu porozitate mare, cu diametrul egal cu cel al suport-filtrului;
- sistem de producere a vidului (pompă de vid, trompă de apă sau seringă);
- apă tamponată sterilă, soluţie de lucru;
- mediu geloză-lactoză cu fucsină şi sulfit de sodiu (mediu Endo) cu următoarea compoziţie:

geloză	100 cm^3
fucsină, soluţie saturată	0,5 cm^3
sulfit de sodiu, soluţie 10%	1,25 cm^3
lactoză, soluţie 30%, sterilă	5 cm^3

Sterilizare

Suportul pentru filtru se sterilizează în autoclav timp de 30 minute la 121^0 C astfel: suportul pentru filtru se montează cu ajutorul unui dop de cauciuc, la flaconul conic cu tub lateral, se împachetează în hârtie, se leagă cu sfoară şi tot ansamblul se sterilizează.

Cutiile Petri, cilindrii gradaţi şi pipetele se împachetează în hârtie şi se sterilizează în etuvă 60 minute la 180^0 C.

Rondelele de hârtie se introduc în cutii Petri care se împachetează în hârtie şi se sterilizează în etuvă 60 minute la 180^0 C.

Membranele filtrante se sterilizează conform indicaţiilor de lucru ale furnizorului de membrane filtrante.

Mărimea probelor

Mărimea volumelor filtrante dintr-o probă se apreciază în funcţie de poluarea apei, astfel că pe o membrană filtrantă să se obţină 20-80 colonii.

Din instalaţiile centrale (rezervor, reţea de distribuţie) se ia un volum de 100 cm^3 probă. Pe o rondelă de hârtie de filtru se filtrează un volum de 50 cm^3 probă şi pe alte rondele de hârtie se filtrează două volume de 25 cm^3.

Din sursele locale de apă se filtrează un volum de 25 cm^3, două volume de 10 cm^3 şi un volum de 5 cm^3, în total 50 cm^3 probă. La nevoie, se pot folosi şi diluţii. În cazul în care, volumul probei filtrate este sub capacitatea suportului pentru filtru, se toarnă întâi o cantitate de soluţie de lucru de apă tamponată sterilă.

Pentru fiecare probă se foloseşte un alt suport pentru filtru. Diferitele volume din aceeaşi probă se filtrează pe acelaşi dispozitiv de filtrare, schimbând după filtrarea fiecărui volum de probă numai hârtia de filtru şi membrana filtrantă, iar suportul pentru filtru se clăteşte cu apă tamponată sterilă, soluţie de lucru.

Filtrarea se începe cu cel mai mic volum din proba respectivă şi se continuă cu celelalte volume în ordine crescătoare.

Tehnica de lucru:

Ansamblul cu suportul pentru filtru se despachetează.

Pe placa suport pentru filtru se aşază o rondelă de hârtie de filtru sterilizată, se umezeşte cu apă tamponată sterilă soluţie de lucru şi deasupra se pune cu pensa o membrană filtrantă.

Dispozitivul de filtrare se racordează la sistemul de vid prin intermediul flaconului tampon şi se filtrează sub vid slab (picătură cu picătură), folosind pentru fiecare volum de probă, o altă membrană filtrantă. După filtrarea fiecărui volum de probă se spală interiorul suportului filtru cu o cantitate de cel puţin 30 cm^3 apă tamponată sterilă, filtrând sub vid. Se repetă operaţia de spălare de încă două ori.

Cu o pensă flambată se ridică membrana filtrantă şi se depune cu suprafaţa care a fost în contact cu proba filtrată pe mediul geloză-lactoză cu fucsină şi sulfit de sodiu turnat în cutii Petri, evitând formarea de bule de aer între membrană şi suprafaţa mediului. Dacă totuşi acestea s-au

format, se ridică membrana filtrantă şi se reaşază cu grijă. Cutiile Petri cu membrane filtrante se introduc cu capacul în jos în termostat pentru incubare la 37^0 C ± $0,5^0$ C, timp de 24 ore.

După incubare se examinează cu lupa prezenţa coloniilor caracteristice de bacterii coliforme la lumina zilei sau lumină fluorescentă.

Calculul rezultatelor:

Numărul de bacterii coliforme (coliformi totali) se calculează după formula:

$$\text{Coliformi totali/100 cm}^3 = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{V_1 + V_2 + V_3} x\ 100$$

în care:

n_1, n_2, n_3 – numărul de colonii caracteristice, dezvoltate pe fiecare membrană filtrantă;

V_1, V_2, V_3 – volumele filtrate din aceeaşi probă (în cm^3).

Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme termotolerante (coliformi fecali)

Bacteriile coliforme termotolerante (coliformi fecali) prezintă caracteristica metabolică de fermentare a lactozei în medii lichide lactozate cu producere de acid şi gaz la 44^0 ± $0,5^0$ C.

Principiul metodei:

Prezenţa bacteriilor coliforme termotolerante (coliformi fecali) se pune în evidenţă plecând de la flacoanele şi eprubetele pozitive în testul de prezumţie pentru bacteriile coliforme (coliformi totali) prin confirmare în mediu selectiv lichid, la temperatura de 44^0 ± $0,5^0$ C în 24 ore. Luând în considerare numărul de tuburi pozitive la temperatura de 44^0 ± $0,5^0$ C se calculează , folosind valorile din tabelele XI şi XII, numărul probabil de bacterii coliforme termotolerante (coliformi fecali).

Materiale necesare:

- eprubete de 16 x 160 mm, cu tuburi de fermentare, sterile;
- pipete Pasteur sterile;
- termostat care asigură temperatura de 44^0 ± $0,5^0$ C;

- mediu bulion-bilă-lactoză-bromcrezol purpur (mediu MacConkey) cu următoarea compoziție:

peptonă tripticar	20 g
lactoză	10 g
săruri biliare	1,5 g
NaCl	5 g
apă distilată	1000 cm^3
bromcrezol purpur, soluție 1% în alcool etilic 96% vol.	12 cm^3

pH = 7,2-7,4. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 15 minute.

- mediu bulion-bilă-lactoză-verde brilliant (BBLV) cu următoarea compoziție:

peptonă	10 g
lactoză	10 g
bilă uscată de bou	20 g
verde brilliant	0,0133 g
apă distilată	1000 cm^3

pH = 7,3. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 15 minute.

Tehnica de lucru:

Pentru confirmarea bacteriilor coliforme termotolerante, din aceleaşi flacoane şi eprubete considerate pozitive la testul de prezumție din care s-au făcut treceri pentru confirmarea bacteriilor coliforme (coliformi totali) se trece cu pipeta Pasteur, una sau două picături, în eprubete care conțin fie mediu bulion-bilă-lactoză-bromcrezol purpur sau mediu bulion-bilă-lactoză-verde brilliant.

Probele se incubează la $44^0 \pm 0,5^0$ C, timp de 24 ore. Virarea culorii mediului în galben (acidifiere) concomitent cu producere de gaz, ca urmare a fermentării lactozei, indiferent de cantitatea degajată în tuburile de fermentare indică prezența bacteriilor coliforme termotolerante (coliformi fecali).

Determinarea numărului probabil de streptococi fecali

Streptococii fecali sunt coci sferici sau ovalari, Gram pozitivi, imobili, izolați, grupați în perechi sau lanțuri scurte, care se dezvoltă la

temperatura de $44^0 \pm 0,5^0$ C, în prezența a 40% săruri biliare şi a azidei de sodiu.

Metoda tuburilor multiple

Principiul metodei:

Prezența streptococilor fecali se pune în evidență prin testul de prezumție, însămânțând proba şi/sau diluții zecimale într-un număr de flacoane şi eprubete cu mediu de îmbogățire lichid la $37^0 \pm 0,5^0$ C, reacția pozitivă fiind evidențiată printr-un test de confirmare într-un mediu selectiv lichid la temperatura de $44^0 \pm 0,5^0$ C, timp de 24 ore sau pe un mediu selectiv la temperatura de $44^0 \pm 0,5^0$ C timp de 48 ore. Plecând de la numărul de tuburi pozitive confirmate se calculează, folosind tabelele XI şi XII, numărul probabil de streptococi fecali.

Materiale necesare:

- ansă bacteriologică;
- eprubete de 16 x 160 mm şi 12 x 120, sterile;
- flacoane de 250 şi 300 cm^3, sterile;
- pipete Pasteur şi pipete gradate de 1 şi 10 ml;
- termostat care asigură temperatura de $37^0 \pm 0,5^0$ C;
- apă tamponată sterilă, soluție de lucru;
- mediu bulion-azidă de sodiu cu următoarea compoziție:

extract de carne	5,4 g
proteoză-peptonă	15 g
glucoză	7,5 g
NaCl	7,5 g
azidă de sodiu	0,2 g
apă distilată	1000 cm^3

pH = 7,2-7,4. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 20 minute.

- mediu bulion-azidă de sodiu dublu concentrat cu următoarea compoziție:

extract de carne	9 g
proteoză-peptonă	30 g
glucoză	15 g
NaCl	15 g
azidă de sodiu	0,4 g
apă distilată	1000 cm^3

pH = 7,2-7,4. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 20 minute.

- mediu bulion-azidă de sodiu şi bromcrezol purpur pentru confirmare cu următoarea compoziţie:

proteoză-peptonă	20 g
glucoză	5 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2,7 g
KH_2PO_4	2,7 g
azidă de sodiu	0,4 g
bromcrezol purpur, soluţie 1% în alcool etilic 96% vol.	2 cm^3
apă distilată	1000 cm^3

pH = 7,2-7,3. Se sterilizează la 115^0 C, timp de 30 minute.

- mediu agar-glucoză-azidă de sodiu-trifenil tetrazol clorură (mediu Slanetz-Bartley) cu următoarea compoziţie:

triptoză	20 g
glucoză	2 g
extract de drojdii	5 g
K_2HPO_4	4 g
azidă de sodiu	0,4 g
agar	10 g
2,3,5 – trifenil tetrazol clorură (TTC), soluţie 1%	10 cm^3
apă distilată	1000 cm^3

pH = 7,2. Se sterilizează prin filtrare în proporţie de 2 cm^3 pentru 200 cm^3 de mediu.

Tehnica de lucru:

➢ **Testul de prezumţie**

- pentru apa recoltată din instalaţiile centrale se însămânţează un volum de 100 cm^3 probă în mediu bulion-azidă de sodiu dublu concentrat;

- pentru apa recoltată din surse locale şi alte categorii de apă decât cele potabile se însămânţează volumul de 55,5 cm^3 probă; volumul de probă de 10 cm^3 se însămânţează în mediu bulion-azidă de sodiu dublu

concentrat, iar volumele de 1 cm^3 şi diluţiile decimale în mediu bulion-azidă de sodiu;

- incubarea se face la $37^0 \pm 0,5^0$ C timp de 48 ore; la 48 ore se face citirea testului de prezumţie şi se fac treceri pentru testul de confirmare din toate flacoanele şi eprubetele unde se constată apariţia turbidităţii cu sau fără sediment.

➢ **Testul de confirmare**

- când confirmarea streptococilor fecali se face în mediu lichid, se trece cu o pipetă Pasteur una sau două picături din fiecare flacon sau eprubetă cu mediu bulion-azidă de sodiu şi bromcrezol purpur;
- se incubează la $44^0 \pm 0,5^0$ C, timp de 24 ore;
- virarea culorii mediului în galben cu sediment pe fundul eprubetei atestă prezenţa streptococilor fecali în apă;
- când confirmarea streptococilor fecali se face pe mediu solid, din fiecare flacon sau eprubetă considerate pozitive se fac însămânţări cu ansa pe mediu agar-glucoză-azidă de sodiu-trifenil tetrazol clorură;
- se fac dispersii cu ansa în striuri, pe sectoare, pentru obţinerea de colonii izolate; cutiile Petri însămânţate se incubează cu capacul în jos la termostat la temperatura de $44^0 \pm 0,5^0$ C, timp de 48 ore; coloniile de streptococi fecali care se dezvoltă sunt rotunde, cu marginea regulată, cu aspect mucos şi sunt de culoare roz, roşu închis.

Calculul rezultatelor:

Determinarea numărului probabil de streptococi fecali în 100 cm^3 probă se face asemănător ca în cazul determinării numărului probabil de bacterii coliforme (coliformi totali), luând în considerare eprubetele în care a avut loc virarea culorii mediului în galben cu sediment pe fundul eprubetei sau coloniile caracteristice de streptococi fecali pe mediul agar-glucoză-azidă de sodiu-trifenil tetrazol clorură.

Metoda membranei filtrante

Este identică cu cea descrisă la pagina 231 cu menţiunea că în locul mediului geloză-lactoză cu fuxină şi sulfit de sodiu (mediul Endo) se foloseşte mediul cu agar-glucoză-azidă de sodiu-trifenil tetrazol clorură.

15.3. EXAMINAREA MICROBIOLOGICĂ A AERULUI

Microbiota aerului este formată din microorganisme foarte diferite care provin din sol, ape, organisme vii şi care aparţin tuturor categoriilor sistematice: bacterii şi spori bacterieni, drojdii (levuri), spori de fungi filamentoşi, alge, protozoare etc.

Cunoaşterea microbiotei aerului din diferite încăperi (dintre care unii germeni pot fi patogeni) prezintă o deosebită importanţă sanitaro-epidemiologică. Ea constituie un indicator important pentru aprecierea gradului de poluare a aerului, a condiţiilor igienice din diferite spaţii închise.

Metode de analiză microbiologică a aerului

În analiza microbiologică a aerului se determină numărul de microorganisme, considerându-se că acestea, prin densitatea lor, ar putea indica, într-o măsură mai mare sau mai mică, gradul de impurificare a aerului.

Repartizarea neuniformă a germenilor în aer şi lipsa unor metode unice de cercetare şi exprimare a rezultatelor, nu au permis încă stabilirea de norme acceptate în aprecierea gradului de impurificare a aerului.

Pornind de la principiile tehnice de recoltare a microorganismelor din aer, metodele actuale de cercetare se împart astfel:

- *metode de sedimentare*;
- *metode aspirative*.

15.3.1. Metoda de sedimentare Koch

Această metodă este larg folosită pentru măsurarea gradului de impurificare microbiană a atmosferei din încăperile locuite şi constă în expunerea plăcilor Petri cu mediu nutritiv steril în diverse locuri ale spaţiului cercetat.

Numărul plăcilor expuse variază în funcţie de dimensiunile încăperii. Plăcile se aşază la o distanţă de circa 1-1,5 m de pereţi, menţinând o distanţă de aproximativ 2 m între cutii, în aşa fel încât toată suprafaţa încăperii să fie împânzită cu acestea (Fig. 95). Înălţimea la care se aşază cutiile diferă după scopul urmărit. Dacă se urmăreşte determinarea microflorei eliminate din căile respiratorii, cutiile Petri se aşază la aproximativ 0,8-1 m de podea. Atunci când se urmăreşte gradul de curăţenie generală, cutiile se aşază mai aproape de podea, la 0,1-0,3 m înălţime.

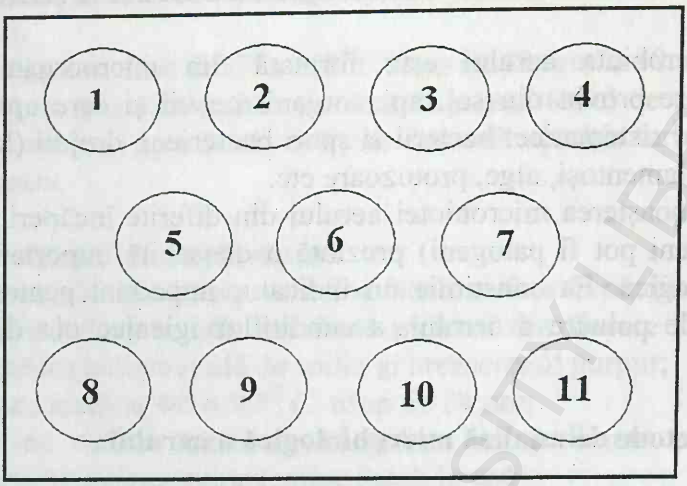


Fig. 95 – Aranjarea plăcilor Petri în vederea determinării microbiotei aerului din încăperi

După turnarea mediului în cutiile Petri şi solidificarea acestuia, cutiile se deschid, iar capacele se aşază cu gura în jos pe o hârtie curată, sterilă.

Timpul de expunere poate varia de la mai puţin de 5 minute la mai mult de 15 minute, în funcţie gradul de poluare a aerului.

În cazul în care se face o expunere prelungită în aerul intens impurificat, se produce o confluenţă a coloniilor, fapt ce împiedică o numărătoare corectă.

În timpul determinărilor, geamurile şi uşile trebuie să fie închise şi este interzisă orice fel de mişcare.

Incubarea se face la 37^0 C, timp de 48 ore.

Numărul de germeni se poate determina după formula:

$$UFC/m^3 \text{ aer} = \frac{N \, x \, 10000}{S \, x \, K}$$

în care:

UFC = unităţi formatoare de colonii;

N = numărul de colonii dezvoltate pe suprafaţa plăcii Petri;

10.000 = coeficient propus de Omelianscki (în timp de 5 minute pe o suprafaţă de 100 cm^2 de mediu nutritiv se sedimentează o cantitate

de microorganisme egală cu numărul de microorganisme din 10 dm^3 de aer);

S = suprafața plăcii Petri (în cm^2);

K = coeficientul timpului de expunere (o unitate pentru fiecare 5 minute de expunere).

Avantajele metodei de sedimentare constau în simplitatea ei şi în faptul că nu necesită nici o aparatură. În afară de determinarea numărului global de germeni se mai pot determina şi anumite specii considerate drept indicatori ai gradului de poluare (streptococul hemolitic, streptococul viridans, stafilococul şi bacilul difteric).

Dezavantajul ei rezidă în faptul că, din conglomeratele de microorganisme care se depun, uneori se formează o singură colonie, la numărare obținându-se mai puțini germeni decât prin alte procedee. În plus, nu se cunoaşte volumul de aer din care se face sedimentarea.

15.3.2. Metode aspirative

Acestea se împart în trei grupe:

- metode de filtrare prin corpuri solide (nisip, sulfat de sodiu);
- metode de filtrare prin lichide (barbotarea aerului prin apă zaharată 1% sterilă, prin bulion de carne sau ser fiziologic, sterile);
- metode de coliziune care constau în dirijarea jetului de aer aspirat pe suprafața mediilor nutritive solide şi însămânțarea directă a suprafeței mediului fără nici o intervenție ulterioară.

Metode de filtrare prin corpuri solide

Metoda Petri

Se bazează pe proprietatea particulelor inerte de a reține germenii din aerul care trece prin ele.

În acest caz se foloseşte nisip fin pentru reținerea microorganismelor din aer. Nisipul se introduce într-un tub de sticlă având lungimea de 9 cm şi diametrul de 6 cm (Fig. 96).

În interiorul tubului se introduc 4 site de cupru care delimitează doi cilindri (C_1 şi C_2). Sitele trebuie să aibă ochiurile foarte mici (0,05 mm). Nisipul se alege în aşa fel încât să nu treacă prin sită. Numai

segmentele C_1 şi C_2 se umplu cu nisip. Partea superioară a tubului se închide cu un dop de vată, iar partea inferioară cu un dop de cauciuc găurit şi prevăzut cu un dop de sticlă, închis la capătul distal cu un dop de vată. Toată instalaţia se sterilizează în autoclav, la 120^0 C, timp de o oră, după care se introduce în etuvă, la 105^0 C până se usucă bine.

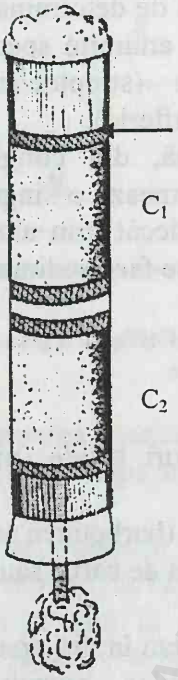


Fig. 96 – Dispozitiv de filtrare a aerului prin corpuri solide

În timpul determinării se înlătură dopurile de vată, iar tubul de sticlă se pune în legătură cu un sistem de aspiraţie (Fig. 97) şi se aspiră aproximativ 10 l de aer/min. Sistemul de aspiraţie conţine ser fiziologic steril.

Aspiraţia aerului se bazează pe scurgerea serului fiziologic din sticla superioară în cea inferioară. După ridicarea probei, nisipul din cele două segmente C_1 şi C_2 se amestecă câte 1 g cu 20 ml de geloză simplă lichefiată şi răcită la 48^0 C. Apoi se toarnă în plăci Petri. După solidificare, cutiile Petri se incubează, la 37^0 C, pentru 48-72 ore. După incubare se numără coloniile apărute atât pe suprafaţa mediului cât şi în profunzimea lui. Se recomandă să se lucreze cu cel puţin 3 probe în paralel. De asemenea, se pot face însămânţări cu nisip provenit din ambele segmente C_1 şi C_2. Cunoscând numărul de colonii dezvoltate în urma filtrării a 10 l de aer, se poate calcula numărul de colonii pentru 1

m^3. De exemplu, dacă din 10 l de aer s-au dezvoltat în medie 50 colonii, atunci 1 m^3 de aer va conține 5000 de germeni.

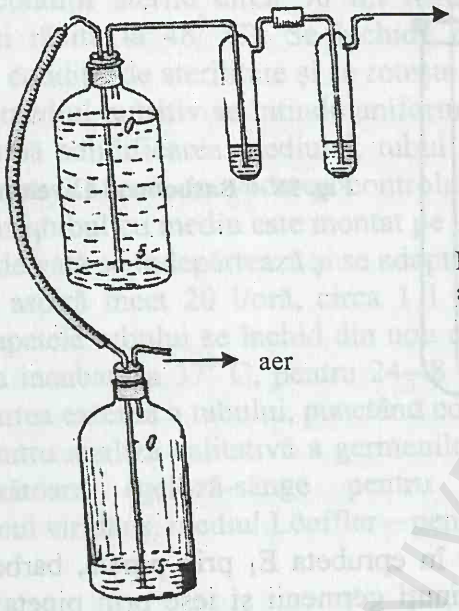


Fig. 97 – Dispozitiv de aspirație a aerului

Metode de filtrare prin lichide

Metoda Laveran

Se bazează pe barbotarea aerului prin lichide care reţin microorganismele. Constă în folosirea unui barbotor alcătuit din două eprubete lungi E_1 şi E_2 unite la partea superioară printr-un tub orizontal T (Fig. 98).

Eprubetele se închid prin dopuri de cauciuc prin mijlocul cărora trece câte o pipetă care trebuie să ajungă până aproape de fundul eprubetelor.

Deschiderea pipetelor se astupă cu dopuri de vată. Pipeta din eprubeta E_1 este marcată la 10 ml, iar pipeta din eprubeta E_2 este gradată în zecimi de ml. Eprubetele astfel pregătite, se împachetează în hârtie şi se sterilizează timp de 30 minute la 121^0 C.

Se înlătură dopul de vată al pipetei introdusă în eprubeta E_1 şi se toarnă în eprubetă până la semn 10 ml apă zaharată 1 % sterilă, în condiţii de strictă sterilitate. Pipeta gradată din eprubeta E_2 se adaptează la sistemul de aspiraţie.

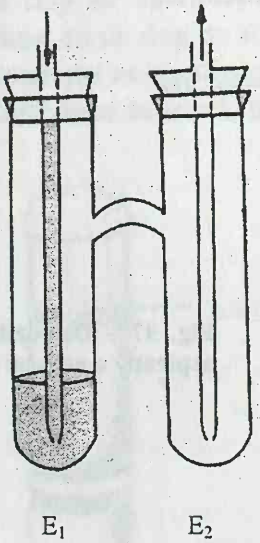


Fig. 98 – Barbotorul Laveran

Aerul aspirat pătrunde în eprubeta E_1 prin pipetă, barbotează în apa zaharată, în care sunt reținuți germenii și iese prin pipeta gradată. După aspirarea cantității necesare de aer, se spală pipeta, apoi înclinând de mai multe ori aparatul se spală tubul de legătură și în cele din urmă și eprubeta E_2. Apa zaharată din eprubeta E_2 aspirată prin pipeta gradată se folosește pentru însămânțarea mediilor nutritive: 1 ml din apa zaharată se adaugă la 20 ml geloză simplă, lichefiată și răcită la 45^0 C. După omogenizare, mediul se toarnă în cutia Petri. Se vor efectua trei însămânțări de acest fel. Dacă apa zaharată conține un număr prea mare de germeni se pot efectua diluții zecimale și apoi din fiecare diluție se fac trei însămânțări. Cutiile Petri însămânțate se incubează la 37^0 C, timp de 48-72 ore. Se numără coloniile apărute atât la suprafață cât și în profunzimea mediului și se calculează numărul de germeni la 1 m^3 de aer.

Metode de coliziune

Metoda Hesse

Se utilizează un tub de sticlă, lung de 70 cm și cu diametrul de 3,5 cm. Se închide la ambele capete cu câte un dop de cauciuc perforat prin care trece un tub de sticlă, având lungimea de 10 cm și diametrul de 1 cm. Ambele tuburi de sticlă se închid cu dopuri de vată. Tot sistemul se

împachetează în hârtie şi se sterilizează la autoclav la 1 atm, timp de 30 minute. Apoi se usucă în etuvă la 105^0 C, timp de aproximativ o oră.

Înainte de întrebuinţare, prin înlăturarea unui dop de cauciuc, se toarnă în condiţii sterile circa 50 ml mediu nutritiv (geloză simplă, lichefiată şi răcită la 48^0 C). Se închide din nou tubul cu dopul de cauciuc, în condiţii de sterilitate şi se roteşte uşor tubul în jurul axei sale până când mediul nutritiv se întinde uniform pe toată suprafaţa internă a tubului. După solidificarea mediului, tubul se introduce în termostat la 37^0 C, pentru 24 ore, în vederea controlului sterilităţii. În momentul întrebuinţării, tubul cu mediu este montat pe un stativ tip trepied (Fig. 99), tamponul de vată se îndepărtează şi se adaptează la sistemul de aspiraţie.

Se aspiră încet 20 l/oră, circa 1 l în 2 minute. După aspirarea aerului, capetele tubului se închid din nou cu tamponul de vată sterilă şi se pune la incubat, la 37^0 C, pentru 24-48 ore. Numărarea coloniilor se face pe partea externă a tubului, punctând coloniile deja numărate.

Pentru analiza calitativă a germenilor se folosesc medii nutritive corespunzătoare (geloză-sânge pentru streptococul hemolitic şi streptococul viridans, mediul Löeffler – pentru bacilul difteric).

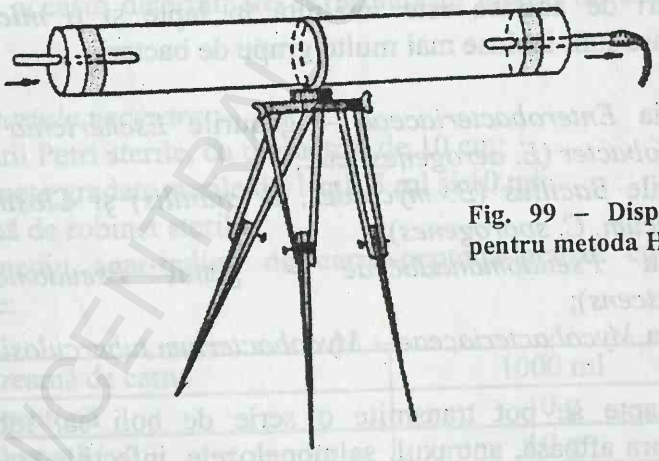


Fig. 99 – Dispozitiv pentru metoda Hesse

Pentru a controla eficienţa sistemului, tamponul de vată de la capătul distal al tubului (pe unde iese aerul) nu se îndepărtează în momentul aspiraţiei decât la sfârşit, când de pe el se fac însămânţări pe mediu nutritiv solid. În acest caz, la sfârşitul aspiraţiei tubul se închide cu

un alt tampon de vată sterilă. În final, se calculează numărul total de germeni găsiți într-un m^3 de aer.

15.4. ANALIZA MICROBIOLOGICĂ A LAPTELUI ŞI A PRODUSELOR LACTATE

Compoziția chimică complexă a laptelui oferă un mediu nutritiv optim pentru dezvoltarea microorganismelor.

În lapte se găseşte o ***microfloră de fermentație lactică*** alcătuită din:

- bacterii lactice homofermentative:
  - genul *Lactobacillus* (*L. lactis*, *L. delbrueckii*);
  - genul *Streptococcus* (*S. lactis*, *S. cremoris*);
  - genul *Pedicoccus* (*P. acidi lactici*, *P. cerevisiae*).
- bacterii lactice heterofermentative:
  - genul *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*);
  - genul *Lactobacillus* (*L. brevis*, *L. buchneri*).
- bifidobacterii:
  - genul *Bifidobacterium* (*B. bifidum*).

Alături de acestea este întâlnită în lapte şi o ***microfloră de poluare*** în care sunt incluse mai multe grupe de bacterii:

- familia *Enterobacteriaceae* – genurile *Escherichia* (*E. coli*), *Enterobacter* (*E. aerogenes*) etc.;
- genurile *Bacillus* (*B. mycoides*, *B. subtilis*) şi *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. sporogenes*);
- familia *Pseudomonadaceae* – genul *Pseudomonas* (*P. fluorescens*);
- familia *Mycobacteriaceae* – *Mycobacterium tuberculosis*.

Prin lapte se pot transmite o serie de boli ca: tuberculoza, bruceloza, febra aftoasă, antraxul, salmonelozele, infecțiile stafilococice şi streptococice etc. De aceea, controlul microbiologic al laptelui şi produselor lactate se impune cu necesitate pentru stabilirea stării igienico-sanitare a produselor.

Examenul microbiologic al laptelui şi produselor lactate constă în:

- ✓ determinarea numărului total de germeni;
- ✓ determinarea numărului probabil de bacterii coliforme;

✓ determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri.

Pentru laptele crud destinat fabricării brânzeturilor se determină şi încărcătura în bacterii anaerobe sporulate.

Deoarece examenele microbiologice directe sunt destul de laborioase şi necesită mult timp, deseori se folosesc teste expeditive pentru determinarea indirectă a numărului de microorganisme din lapte, cum este cel de reducere cu albastru de metilen, resazurină, verde Janus (testul sau proba reductazei).

Recoltarea probelor pentru analiză

Materialele folosite pentru recoltarea probelor (spatule, linguri, recipiente de sticlă, pipete, cuţite etc.) trebuie să fie curate şi sterilizate fie în autoclav (121^0 C, timp de 30 minute), fie în etuvă (180^0 C, timp de o oră). Numărul probelor pentru analize se iau în funcţie de numărul ambalajelor sau al bucăţilor dintr-un lot. După recoltarea probelor, în condiţii sterile, acestea se analizează după maximum 4 ore.

15.4.1. Determinarea numărului total de germeni

Prin această determinare se urmăreşte gradul de contaminare al produsului.

Materiale necesare:

- cutii Petri sterile, cu diametrul de 10 cm;
- pipete gradate sterile de 1 ml, 5 ml şi 10 ml;
- apă de robinet sterilă;
- mediu agar-bulion de carne-peptonă-lactoză cu următoarea compoziţie:

zeamă de carne	1000 ml
peptonă	10 g
lactoză	10 g
NaCl	5 g
agar	18 g

pH=7,2-7,4. Sterilizarea se face la 110^0 C, timp de 30 minute.

- mediu agar-zer de lapte-peptonă cu următoarea compoziţie:

zer de lapte	1000 ml
peptonă	10 g
NaCl	5 g
agar	18 g

pH=7,2-7,4. Sterilizarea se face la 110^0 C, timp de 30 minute.

În loc de cele două medii nutritive se mai poate utiliza şi geloza simplă.

Tehnica de lucru:
Se aplică metoda descrisă la începutul acestui capitol.

- Pentru determinarea cantitativă a bacteriilor din **laptele pasteurizat** se face media celor două plăci (însămânțate cu aceeaşi diluție) se înmulțește cu factorul diluției obținându-se numărul de microorganisme/ml (Fig. 100).

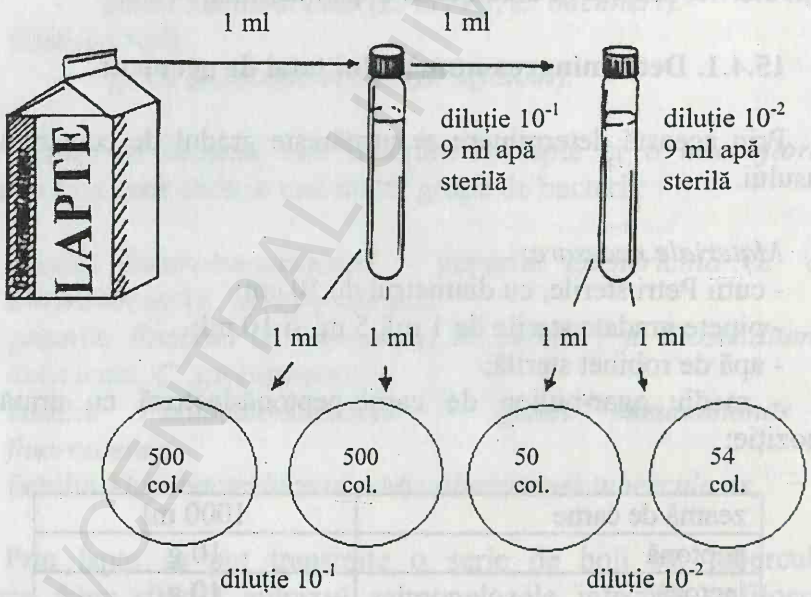


Fig. 100 – Determinarea cantitativă a bacteriilor din laptele pasteurizat

Exemplu:
50 colonii + 54 colonii = 104 colonii
104 : 2 (plăci) = 52 colonii
52 colonii x 100 = 5200 microorganisme/ml lapte pasteurizat

➢ Pentru determinarea cantitativă a bacteriilor din **laptele crud** se foloseşte următoarea tehnică de lucru (Fig. 101):

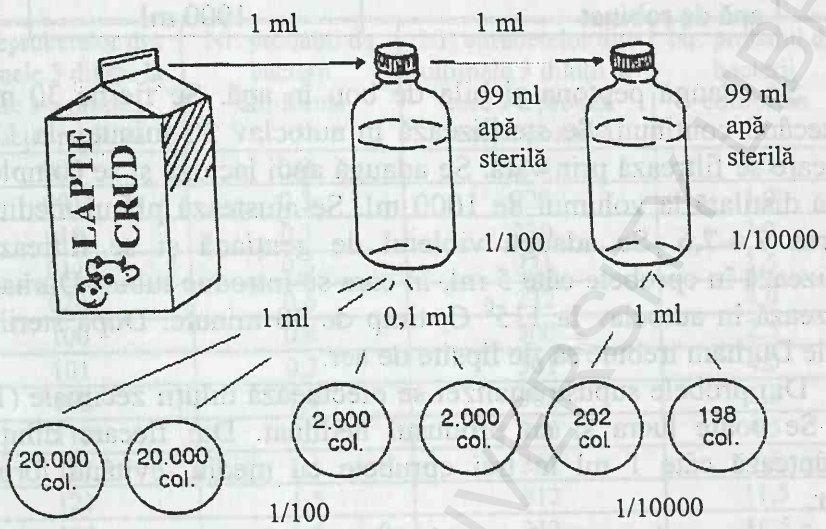


Fig. 101 – Determinarea cantitativă a bacteriilor din laptele crud

Exemplu:
202 colonii + 198 colonii = 400 colonii
400 : 2 (plăci) = 200 colonii
200 colonii x 10000 = 2.000.000 microorganisme/ml lapte crud

15.4.2. Determinarea numărului probabil de bacterii coliforme

Gradul de contaminare al laptelui sau al produselor lactate reflectă condiţiile igienico-sanitare ale proceselor de fabricaţie.

Pentru determinarea numărului de germeni coliformi se poate aplica testul prezumtiv şi cel de confirmare, descrise la analiza bacteriologică a apei.

În industria laptelui se utilizează mai frecvent mediul Kessler-Swenarton cu următoarea compoziţie:

bilă de bou proaspătă, filtrată	50 ml
peptonă	10 g
lactoză	10 g
violet de gențiană 1%	4 ml
apă de robinet	1000 ml

Se adaugă peptona şi bila de bou în apă. Se fierbe 30 minute, amestecând continuu. Se sterilizează în autoclav 30 minute, la 115^0 C, după care se filtrează prin vată. Se adaugă apoi lactoza şi se completează cu apă distilată la volumul de 1000 ml. Se ajustează pH-ul mediului la valoarea 7,4-7,6. Se adaugă violetul de gențiană şi se filtrează. Se repartizează în eprubete câte 5 ml, în care se introduc tuburi Durham. Se sterilizează în autoclav la 115^0 C, timp de 30 minute. După sterilizare, tuburile Durham trebuie să fie lipsite de aer.

Din probele supuse analizei se efectuează diluții zecimale (10^{-1} – 10^{-5}). Se poate lucra şi cu produsul nediluat. Din fiecare diluție se însămânțează câte 1 ml în trei eprubete cu mediu, evitând formarea bulelor.

Incubarea durează 48 ore la 37^0 C. Se urmăreşte apariția bulelor de gaz în tuburile Durham. În cazul în care au apărut bule de gaz în una sau mai multe eprubete, gazul ocupând cel puțin 1/10 din înălțimea tubului de fermentație, testul este pozitiv.

Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme se face prin numărarea eprubetelor pozitive la ultimele diluții la care testul este pozitiv. În acest scop, se întocmeşte un tabel în care se trece numărul eprubetelor pozitive în cazul fiecărei diluții (Tabel XIII).

Tabel XIII – Stabilirea eprubetelor pozitive pentru germenii coliformi

Numărul eprubetei	Diluție					
	Produs nediluat	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-	-
3	+	+	+	-	-	-

În acest caz, ultimele trei diluții la care a apărut reacția pozitivă sunt: 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, iar numărul eprubetelor cu reacție pozitivă este 321. Pentru această combinație se caută în tabelul XIV şi se găseşte cifra 15. La această valoare citită se adaugă un număr de zerouri egal cu diferența dintre prima diluție luată în calcul şi diluția însămânțată inițial. În cazul

exemplului de mai sus se adaugă un zero şi deci numărul probabil de bacterii coliforme la 1 ml lapte sau 1 g produs lactat va fi 150.

Tabel XIV– Stabilirea numărului probabil de bacterii coliforme din lapte

Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme	Nr. eprubetelor din ultimele 3 diluţii la care s-a produs reacţie pozitivă	Nr. probabil de bacterii coliforme
000	0,0	222	3,5
001	0,3	223	4,0
010	0,3	230	3,0
011	0,6	231	3,5
020	0,6	232	4,0
100	0,4	300	2,5
101	0,7	301	4,0
102	1,1	302	6,5
110	0,7	310	4,5
111	1,1	311	7,5
121	1,5	312	11,5
130	1,6	313	16,5
200	0,9	320	9,5
201	1,4	321	15,0
202	2,0	322	20,0
210	1,5	323	30,0
211	2,0	330	25,0
212	3,0	331	45,0
220	2,0	332	120,0
221	3,0	333	140,0

15.4.3. Determinarea numărului de drojdii şi mucegaiuri

Numărul acestor tipuri de microorganisme indică starea condiţiilor igienico-sanitare în procesul de producţie şi păstrare a probelor.

Pentru ***determinarea numărului de drojdii*** se poate folosi un mediu de cultură (malţ agarizat) format din:

făină de malţ	250 g
agar	30 g
apă de robinet	1000 ml

La făina de malț se adaugă apa, după care se încălzește la 57^0 C și se menține la această temperatură timp de o oră. Se ridică apoi treptat temperatura până la 63^0 C, menținându-se la această temperatură până când dispare reacția amidonului cu iodul (nu mai apare culoarea albastră). Se filtrează prin pânză, iar la lichidul obținut se adaugă agarul, se topește și se filtrează la cald în autoclav, prin vată. Mediul se sterilizează la 121^0 C, timp de 20 minute.

În momentul întrebuințării, mediul pentru cultivarea drojdiilor se lichefiază pe baie de apă și se răcește la 45^0 C. Înainte de a fi turnat în cutii Petri, la acesta se adaugă 0,2 ml dintr-o soluție sterilă de acid lactic 5% (sterilizarea acidului lactic se face la 110^0 C, timp de 30 minute).

Pentru fiecare diluție se însămânțează, cu câte 1 ml, cel puțin 3 cutii Petri.

Mediul se toarnă în cutii Petri odată cu diluția, se omogenizează bine, iar după solidificare, se pune la incubat la temperatura camerei, timp de 5 zile. După incubare, se numără coloniile dezvoltate și se face media acestora din cele 3 cutii, pentru fiecare diluție în parte.

Pentru ***determinarea numărului de mucegaiuri*** se utilizează mediul cu cartof-glucoză-agar:

infuzie din 200 g cartofi	1000 ml
glucoză	20 g
agar	15 g

Pentru obținerea infuziei de cartofi se fierb 200 g cartofi tăiați felii în 100 ml apă distilată timp de o oră. Amestecul se filtrează prin tifon dublu prin stoarcere. La filtratul obținut se adaugă apa distilată până la volumul de 1000 ml. Apoi se introduce glucoza și se agită bine până la completa dizolvare a acesteia. Se adaugă agarul, se topește în autoclav la 110^0 C, timp de 20 minute, se filtrează prin vată la cald. Mediul se sterilizează în autoclav la 110^0 C, timp de 30 minute.

Pentru cultivarea mucegaiurilor, se utilizează procedeul descris la drojdii. Singura deosebire este aceea că la mediul lichefiat și răcit la 45^0 C, se adaugă 0,1-0,5 ml soluție sterilă de acid tartric 10% (sterilizarea acidului tartric se face la fel ca și în cazul acidului lactic). Cantitatea de acid tartric se tatonează în așa fel încât după adăugarea sa, mediul să aibă pH=3,5. Soluția de acid tartric se adaugă la mediu după o prealabilă încălzire la 45^0 C. Incubarea are loc tot la temperatura camerei, durata

fiind de 5-10 zile. După incubare, se stabileşte numărul mediu de colonii de mucegai/cutia Petri.

15.4.4. Proba reductazei

Prin proba reductazei se determină în mod indirect numărul de microorganisme din lapte, prin măsurarea activităţii lor metabolice. Numărul de microorganisme indică gradul de contaminare al laptelui. Această probă se poate efectua cu albastru de metilen, resazurină sau verde Janus.

Proba reductazei cu albastru de metilen

Această metodă constă în decolorarea laptelui în care s-a adăugat albastru de metilen, în raport cu numărul de microorganisme. Fenomenul se datorează activităţii oxido-reducătoare a microorganismelor conţinute în lapte. Cu cât numărul acestora este mai mare şi cu cât activitatea lor este mai intensă, cu atât fenomenul de decolorare va fi mai rapid.

Tehnica de lucru:

Într-o eprubetă sterilă (capacitate 50 ml) se introduc 0,5 ml dintr-o soluţie de albastru de metilen proaspăt preparată (5 ml soluţie alcoolică saturată de albastru de metilen, la care se adaugă 195 ml apă distilată) şi 20 ml din proba de lapte de cercetat, încălzit în prealabil la 38-40^0 C. Eprubeta se astupă cu un dop steril de cauciuc şi se introduce într-o baie de apă la temperatura de 37^0 C, la adăpost de lumină. Decolorarea se urmăreşte la trei intervale de timp: după 20 minute, după 2 ore şi 5 ½ ore. Analiza poate fi considerată terminată când întreaga probă s-a decolorat. În raport cu timpul de decolorare, laptele se împarte în 4 clase (Tabel XV):

Tabel XV – Stabilirea numărului probabil de germeni prin proba reductazei cu albastru de metilen

Intervalul de timp la care a apărut decolorarea	Calitatea laptelui	Clasa	Nr. probabil de germeni la 1 ml lapte
peste 5 ½ ore	bună	I	sub 500.000
de la 5 ½ ore până la 2 ore inclusiv	satisfăcătoare	II	de la 500.000 până la 4 mil.
sub 2 ore până la 20 min inclusiv	slabă	III	de la 4 la 20 mil.
sub 20 min	foarte slabă	IV	peste 20 mil.

Proba reductazei cu resazurină ($C_{12}H_6NNaO_4$)

Resazurina este o oxazonă care introdusă în lapte dă o colorație albastră. Sub acțiunea microorganismelor din lapte ea este redusă în resorufină de culoare roșie-roz și apoi în dihidroresorufină incoloră.

Tehnica de lucru:

Într-o eprubetă obișnuită se introduce 1 ml resazurină, soluție apoasă 0,05 % sterilă (sterilizată prin tindalizare) proaspăt preparată, peste care se adaugă 10 ml din laptele supus analizei. Se închide eprubeta cu dop de cauciuc steril, se omogenizează bine conținutul și se introduce pentru o oră la 37^0 C. După incubare, proba se agită din nou pentru uniformizarea amestecului și se apreciază nuanța de culoare la care a ajuns amestecul lapte-resazurină în funcție de care se apreciază calitatea acestuia (Tabel XVI).

Tabel XVI – Aprecierea calității laptelui în funcție de rezultatele probei reductazei cu resazurină

Nuanța de culoare	Calitatea laptelui	Clasa
albastru oțel-albastru pastel	bună	I
violet albăstrui-violet roșu	satisfăcătoare	II
roz-roz spre alb	slabă	III
alb	foarte slabă	IV

16. STUDIUL PRINCIPALELOR GRUPE ECOFIZIOLOGICE DE MICROORGANISME CARE PARTICIPĂ LA CIRCUITUL ELEMENTELOR BIOGENE ÎN NATURĂ

16.1. CIRCUITUL AZOTULUI

Prin termenul de ***"circuitul azotului"*** este desemnat ansamblul transformărilor pe care le suferă azotul în natură. Aceste transformări, dintre care cele mai importante sunt de natură microbiană, joacă un rol primordial, conducând pe de o parte la câştiguri sau la pierderi de azot în sol, iar pe de altă parte la reținerea lui în sol sub forme asimilabile pentru plante (Fig. 102)

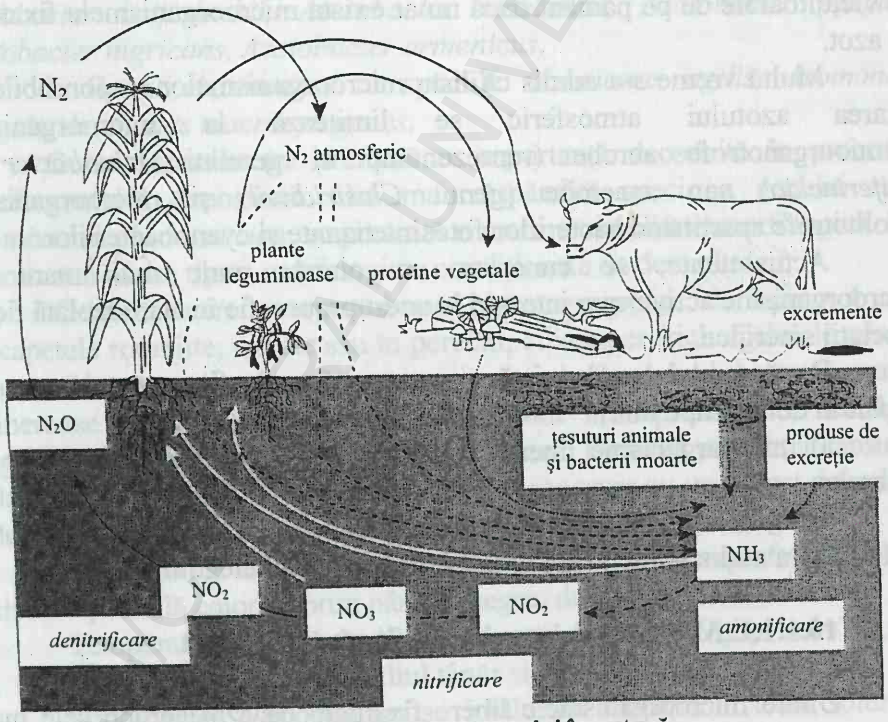


Fig. 102 – Circuitul azotului în natură

Procesele care conduc la îmbogățirea solului în azot sunt, după natura lor, de două tipuri:

a) procese de natură microbiană:

- ✓ fixarea azotului atmosferic de către microorganismele libere fixatoare de azot;
- ✓ fixarea azotului atmosferic de către microorganismele simbiotice fixatoare de azot.

b) procese de natură nemicrobiană:

- ✓ aport de azot prin apele meteorice şi apele de irigare;
- ✓ adsorbţia amoniacului atmosferic.

16.1.1. Fixarea azotului atmosferic

Fixarea azotului atmosferic de către microorganisme reprezintă o etapă importantă din circuitul azotului. Făcând abstracţie de cantităţile mici de azot molecular care devin accesibile plantelor pe cale fizico-chimică, prin fixarea lui în sol în cursul descărcărilor electrice şi cu apele de precipitaţii, cea mai mare parte a azotului atmosferic ar rămâne nefolosită de vieţuitoarele de pe pământ dacă nu ar exista microorganismele fixatoare de azot.

Multă vreme s-a admis că lista microorganismelor responsabile de fixarea azotului atmosferic se limitează la microorganisme chimioorganotrofe aerobe (reprezentanţi ai genului *Azotobacter* şi *Beijerinckia*) sau anaerobe (genul *Clostridium*) şi microorganisme fotolitotrofe aparţinând bacteriilor fotosintetizante şi cyanobacteriilor.

Actualmente, se cunoaşte un număr mult mai mare de microorganisme active care intervin în acest proces, fie în stare izolată fie în asociaţii sinergice.

După modul lor de viaţă, microorganismele fixatoare de azot se împart în două grupe mari:

a) microorganisme libere fixatoare de azot, care pot fi aerobe şi anaerobe;

b) microorganisme simbiotice fixatoare de azot, care fixează azotul molecular în nodozităţile plantelor leguminoase sau neleguminoase.

16.1.1.1. Microorganisme libere fixatoare de azot

Dintre microorganismele libere fixatoare de azot aerobe cele mai importante aparţin familiei ***Azotobacteraceae*** (conform *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, ed., a IX-a, 1989).

Reprezentanţii acestei familii se prezintă morfologic sub forma unor celule mari, predominant bastonaşe, până la oval, dar care îşi pot schimba aspectul morfologic în funcţie de vârsta culturii şi de condiţiile de cultivare.

Celulele sunt grupate adesea în perechi şi sunt mobile datorită prezenţei flagelilor peritrichi sau polari. Se cunosc şi forme imobile. Sunt Gram-negative în stadiul tânăr şi Gram-pozitive în stadiul matur. Nu formează endospori. Unele specii formează chlamidospori (*Azotobacter chroococcum*) sau microchişti rezultaţi din îngroşarea peretelui celulei vegetative şi acumularea unor substanţe de rezervă. Cele mai multe tulpini prezintă o capsulă mucilaginoasă care înconjoară una sau mai multe celule şi care este cu atât mai mare cu cât conţinutul mediului de cultură în glucide este mai ridicat. Unele tulpini produc pigmenţi fluorescenţi.

Sunt microorganisme heterotrofe, capabile să fixeze azotul molecular într-un mediu fără azot, dar în prezenţa unei surse organice de carbon.

Familia ***Azotobacteraceae*** cuprinde două genuri:

1. Genul ***Azotobacter***, cu speciile: *Azotobacter chroococcum, Azotobacter beijerinckii, Azotobacter vinelandii, Azotobacter paspali Azotobacter nigricans, Azotobacter armenicus*.
2. Genul ***Azomonas***, cu speciile: *Azomonas agilis, Azomonas insignis, Azomonas macrocytogenes*.

Genul ***Azotobacter*** prezintă o importanţă deosebită în procesul fixării azotului atmosferic. Cea mai răspândită specie a genului este *Azotobacter chroococcum*, ce prezintă o mare variabilitate morfologică. Se cunosc mai multe tipuri morfologice, condiţionate de dezvoltare.

Celulele tinere au aspectul unor bastonaşe groase de 2 μm x 4 μm, cu capetele rotunjite, izolate sau în perechi, ciliate peritrich. Celulele adulte sunt ovalare sau cu aspectul unor coci mari de 2 μm x 1,2 μm şi conţin numeroase granulaţii. Celulele bătrâne sunt aproape sferice, numărul flagelilor scade şi celulele îşi pierd mobilitatea. Datorită prezenţei capsulei gelatinoase preparatele de *Azotobacter chroococcum* au un aspect deosebit: celulele se găsesc întotdeauna la o anumită distanţă între ele (Fig. 103).

Este aerob şi facultativ microaerofil. Formează la suprafaţa mediilor lichide o peliculă colorată brun până la negru, datorită melaninei.

Temperatura optimă de dezvoltare este de 25-28^0 C şi pH-ul=7-7,5.

Este Gram-negativ în stadiul tânăr şi Gram-variabil la maturitate.

Azotobacter chroococcum se întâlneşte aproape în toate solurile, frecvenţa cea mai mare fiind în solurile cultivate, fertile.

Izolarea şi cultivarea bacteriilor din genul *Azotobacter*

În acest scop se pot folosi diferite medii de cultură.

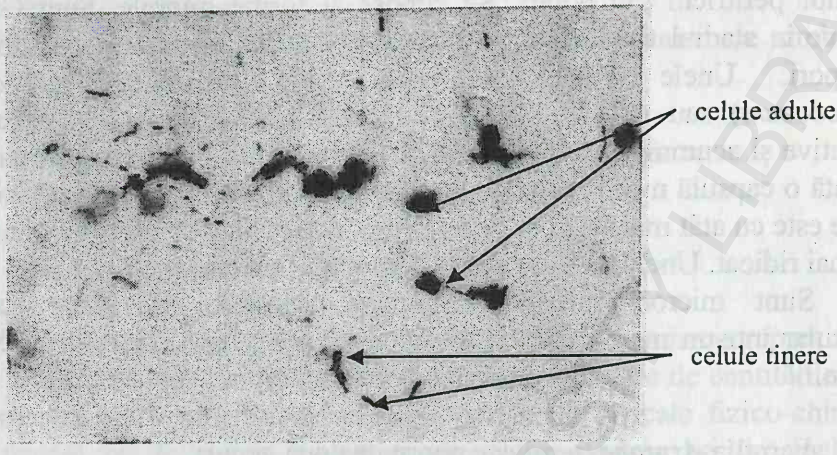


Fig. 103 – *Azotobacter chroococcum* (1000 x)

Cel mai adesea se foloseşte un mediu nutritiv cu manită sau glucoză (conceput şi modificat de Skerman, 1979), mediu care are următoarea compoziţie:

glucoză	20 g
$MgSO_4$	0,2 g
K_2PO_4	0,2 g
NaCl	0,2 g
K_2SO_4	0,2 g
$CaCO_3$	5 g
apă distilată	1000 ml

Mediul se repartizează în balonaşe de 100 cm^3, se sterilizează la 115^0 C, timp de 20 minute şi se însămânţează cu o mică cantitate de sol gras de grădină. Se incubează la $25\text{-}28^0$ C. După 7-10 zile se observă formarea la suprafaţa lichidului de cultură a unei pelicule la început de culoare gri-albicioasă care apoi devine brun-închis. Din această peliculă se efectuează preparate care se supun examenului microscopic.

Dacă la acest mediu lichid se adaugă 15-18 g‰ agar se obţine un mediu solid care după sterilizare se răceşte la $45\text{-}50^0$ C şi se repartizează în cutii Petri sterile. Însămânţarea se face cu 1 ml suspensie de sol diluată. Se imprimă plăcilor o mişcare de rotaţie pentru amestecarea suspensiei de sol cu mediul de cultură. După solidificarea mediului, plăcile Petri sunt incubate timp de 4-5 zile la $25\text{-}28^0$ C. După acest interval de timp se

constată dezvoltarea unor colonii de *Azotobacter* colorate în galben-brun închis. Prin repicări repetate şi control microscopic se obţin, în final, culturi pure de *Azotobacter*.

Pentru cultivarea speciilor de *Azotobacter* se poate folosi şi agarul cu extract de morcovi, mediu produs de C. Stapp. O cantitate de 500 g morcovi tocaţi fin se fierb timp de 30 minute în 1000 ml apă de robinet. După completarea apei evaporate, se neutralizează extractul cu o soluţie de 0,3% Na_2CO_3. Se îndepărtează precipitatul prin filtrare şi se adaugă filtratului agar în proporţie de 2 g %. Mediul se sterilizează 30 minute la o atmosferă. După însămânţare şi incubare timp de 7-8 zile la 25-28^0 C, se obţin colonii de *Azotobacter*.

O apreciere sumară asupra bogăţiei unui sol în *Azotobacter* poate fi făcută simplu şi rapid printr-o tehnică propusă de S. Winogradsky, denumită "solul moulei". Solul de examinat este el însuşi mediul de cultură. După încorporarea unei substanţe carbonate organice uşor utilizabilă şi o umezire prealabilă, *Azotobacter* se dezvoltă electiv la suprafaţă, formând colonii.

Tehnica de lucru:

Se cântăresc cca. 100 g sol cernut şi omogenizat în care se încorporează 1 g piruvat de sodiu. Se aduce cu apă sterilă până la o consistenţă păstoasă, amestecând cu o lamă de sticlă flambată. Se repartizează solul astfel preparat în cutii Petri mici cu diametrul de 5-6 cm şi cu o lamă de sticlă se netezeşte suprafaţa. Cutiile Petri se introduc apoi fără capac într-un recipient mai mare (în care trebuie să se menţină o atmosferă umedă) şi se incubează la 27^0 C, timp de şase zile. După trei şi şase zile se examinează plăcile Petri şi se observă coloniile de *Azotobacter*, care au aspectul unor pete strălucitoare şi uşor detaşabile. Spre a patra zi ele încep să se brunifice. Se apreciază bogăţia în *Azotobacter* după numărul coloniilor. Absenţa coloniilor nu înseamnă întotdeauna şi absenţa lui *Azotobacter* din sol. Solul carenţat în fosfor sau calciu nu permite dezvoltarea coloniilor în condiţiile descrise mai sus.

O altă grupă de bacterii libere fixatoare de azot molecular o formează cele anaerobe care aparţin mai multor genuri. Dintre acestea, o importanţă deosebită prezintă genul *Clostridium*.

Clostridium pasteurianum se prezintă în stadiu vegetativ sub formă de bastonaşe drepte sau uşor curbate de 0,5-0,8/3,4-13,2 μm şi sub formă de fus în stadiu sporulat. Sporii sunt deformanţi şi dispuşi central, terminal şi subterminal. Sporul matur este înconjurat de o capsulă gelatinoasă, de formă triunghiulară, cu capetele puţin rotunjite. Prezenţa acestei capsule

este caracteristică pentru *Clostridium pasteurianum* (Fig. 104).

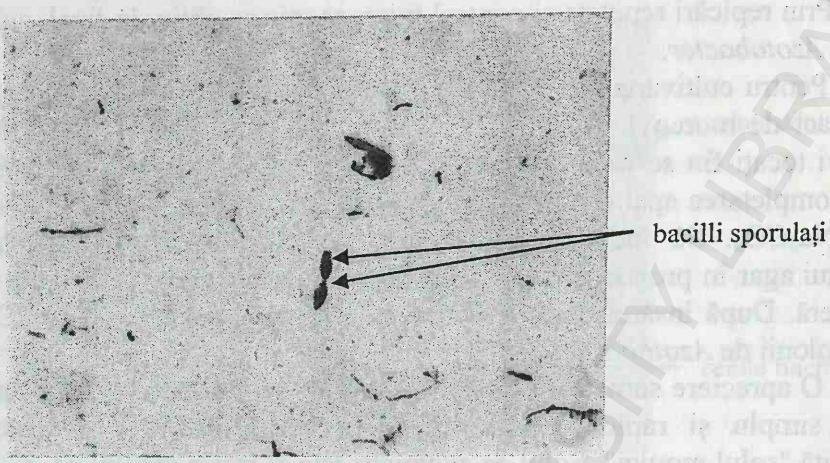


Fig. 104 – *Clostridium pasteurianum* (1000 x)

În unele condiții de cultivare, această bacterie dă forme cu aspecte din cele mai bizare: filamente lungi cu spori la unul din capete sau uneori se observă desfacerea celulelor într-o serie de formațiuni asemănătoare cocilor.

În celulele tinere citoplasma este omogenă şi se colorează cu soluție Lugol în galben. Înainte de a începe sporularea apare în ea glicogen şi incluziuni de amidon, din care cauză cu soluție Lugol se colorează în albastru. După maturarea sporului coloraţia dispare.

Clostridium pasteurianum este mobil, cu flageli dispuşi peritrich, uneori imobil. Este strict anaerob sau anaerob-aerotolerant. Temperatura optimă de dezvoltare este de 28-30^0 C. Se dezvoltă bine în medii ce conţin hidraţi de carbon fermentescibili. Este o bacterie butirică adevărată producând în cursul fermentării hidraţilor de carbon acid butiric, acid acetic şi gaze.

Pentru dezvoltarea şi izolarea acestei bacterii se foloseşte următorul mediu:

glucoză	20 g
$MgSO_4$	urme
KH_2PO_4	1 g
NaCl	0,5 g
$FeSO_4$	urme
$MnSO_4$	urme
apă distilată	1000 ml

Mediul se repartizează în balonaşe cu fundul plat cu capacitate de 100 ml şi se adaugă în fiecare vas câte 2 g $CaCO_3$. Se însămânţează cu sol şi se incubează la 25-30^0 C. După câteva zile la suprafaţa mediului apare o peliculă formată din bacterii aerobe, iar pe fundul vasului începe fermentarea butirică cu degajare abundentă de gaze. *Clostridium pasteurianum* se dezvoltă în depozitul de $CaCO_3$ de pe fundul vasului, de unde se ia material pentru efectuarea preparatelor.

Numeroase alte specii de ***Clostridium*** pot fixa azotul dar în cantităţi reduse. În general, s-a constatat că speciile de ***Clostridium*** fixatoare de azot atmosferic au o răspândire mai mare decât speciile aerobe de ***Azotobacter***. Datorită modului lor de viaţă anaerob şi a pH-ului optim relativ scăzut, ele se pot găsi în solurile mai puţin aerisite, precum şi în solurile de pădure şi păşune, compacte şi acide. Ele sunt prezente însă şi în solurile cultivate, bine aerisite şi bogate în humus. În acest caz, sunt prezente aproape exclusiv în interiorul particulelor structurale ale solului. În majoritatea cazurilor ele acceptă, ca şi fixatorii de azot aerobi, o simbioză cu bacteriile celulozolitice.

16.1.1.2. Bacteriile simbiotice fixatoare de azot atmosferic

Bacteriile implicate în fixarea simbiotică a azotului la leguminoase aparţin familiei ***Rhizobiaceae*** (genurile ***Rhizobium, Bradyrhizobium*** ş.a).

Speciile genului ***Rhizobium*** sunt răspândite, de regulă, în rizosferă. Celulele bacilare (Fig. 105) au diametrul de 1-1,4 x 0,6-0,8 μm. Sunt Gram negative, ciliate şi foarte mobile. În nodozităţile rădăcinilor leguminoaselor (Fig. 106) celulele iau forma literelor T, X şi Y. Sunt bacterii aerobe, heterotrofe şi nu formează spori. Temperatura optimă de dezvoltare este de 25^0 C.

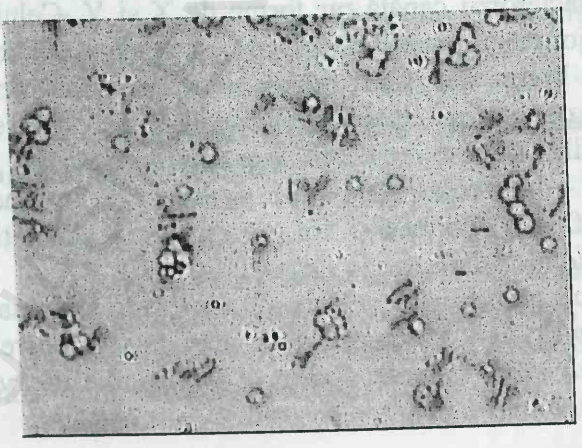


Fig. 105 – *Rhizobium* sp. (1000 x)

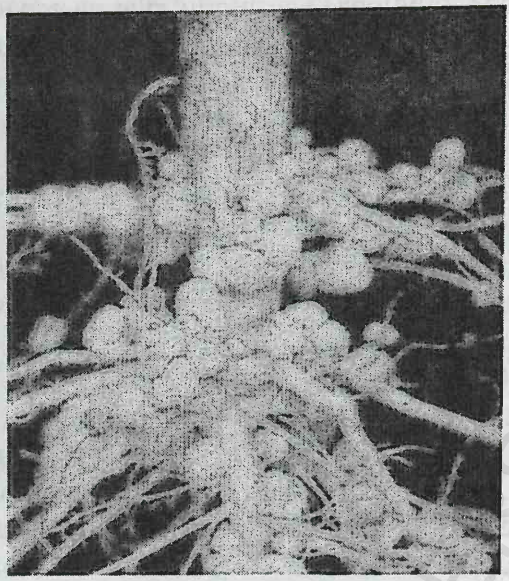


Fig. 106 – Nodozități fixatoare de azot pe rădăcinile de soia

Principalele specii ale genului ***Rhizobium*** sunt:

- ✓ *Rhizobium leguminosarum* – celulele au diametrul de 0,5-0,9 μm și o lungime de 1,2-3 μm. Pe medii de cultură formează colonii albicioase și mucilaginoase. Celulele sunt flagelate peritrich. În sol se găsesc pe rădăcinilor plantelor de *Pisum, Lathyrus, Vicia, Lens.*
  - o *Rhizobium leguminosarum* var. *phaseoli* – celule mai mici decât la *Rhizobium leguminosarum*, flagelate peritrich. Coloniile sunt gri albicioase și mai puțin mucilaginoase ca la *Rhizobium leguminosarum.* În sol se găsesc pe suprafața rădăcinilor de *Phaseolus vulgaris* și *Phaseolus coccineus.*
  - o *Rhizobium leguminosarum* var. *trifolii* – celule flagelate peritrich. Bacteroizii capătă rar forme de X și Y. Celulele sunt în majoritatea cazurilor piriforme și prezintă vacuole. Depozitele bacteriene sunt inițial albe, iar mai târziu colorate în gri și cu aspect de masă gumoasă. Ele se găsesc în nodozitățile rădăcinilor de *Trifolium* sp. și în sol.
- ✓ *Rhizobium meliloti* – bacteroizii din noduli au aspect de bastonaș. Celulele au 2-3 flageli peritrichi. Se găsesc în nodozitățile rădăcinilor de *Melilotus, Medicago* și *Trigonella.*
- ✓ *Rhizobium loti* – bacteroizii din noduli au aspect de bastonaș; celulele au un flagel polar. Formează nodozități la următoarele plante: *Lotus corniculatus, Lotus tenuis, Lupinus densiflorus, Anthyllis vulneralia, Mimosa* etc.

Speciile genului ***Bradyrhizobium*** sunt reprezentate morfologic prin celule cu aspect de bastonaş (0,5-0,9 x 1,2-3 μm), nesporulate, Gram negative, mobile (cu un flagel polar) şi aerobe. Temperatura optimă de dezvoltare este de 25-30^0 C, iar pH-ul optim 6-7. Coloniile sunt circulare, opace, rareori translucide sau albe, convexe şi cu o textură granulară; nu depăşesc 1 mm în diametru după 5-7 zile de incubare pe mediu agarizat cu manitol-extract de drojdii-săruri minerale. Sunt chemoorganotrofe, utilizând o gamă largă de hidraţi de carbon (cu excepţia amidonului şi celulozei) şi săruri ale acizilor organici ca surse de carbon. Unele tulpini pot creşte chemolitotrof în prezenţa hidrogenului, dioxidului de carbon şi a concentraţiilor scăzute de oxigen.

✓ *Bradyrhizobium japonicum* – celulele sunt flagelate monotrich. Formează colonii gri-albicioase şi se găsesc în nodozităţile de pe rădăcinile de *Glycine, Vigna, Arachis, Phaseolus*.

Formele infecţioase de *Rhizobium* şi *Bradyrhizobium*, adică formele care pătrund prin perişorii absorbanţi în ţesuturile rădăcinii poartă numele de bacteroizi. O caracteristică structurală a bacteroizilor este prezenţa unei membrane de acoperire (manşon) care înveleşte unul sau mai mulţi bacteroizi. Se pare că acest manşon este produs de celulele plantei gazdă cu rol de a izola, într-o anumită măsură, bacteroizii de celulele radiculare. În momentul când nodozităţile se pigmentează în roşu, începe şi fixarea azotului molecular. O secţiune longitudinală printr-o nodozitate, în această fază, arată patru zone de ţesuturi diferenţiate:

- Zonă corticală externă sau cortexul nodozităţii, formată din celule parenchimatice;
- Zonă meristematică în care celulele se divid;
- Sistemul vascular, dispus sub cortex şi separat de acesta prin endoderma nodozităţii;
- Zona centrală infectată, separată de sistemul vascular prin mai multe rânduri de celule parenchimatice.

Evidenţierea bacteriilor din nodozităţile radiculare ale plantelor leguminoase

Materiale necesare:

- rădăcini cu nodozităţi de la plante leguminoase;
- seminţe de lucernă (*Medicago sativa*);
- mediu nutritiv cu manitol, extract de drojdii şi roşu Congo, având următoarea compoziţie:

manitol	10 g
extract de drojdii	0,2 g
K_2HPO_4	0,5 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
$CaCO_3$	3 g
roşu Congo, sol apoasă 1 %	2,5 ml
agar	15 g
apă distilată	1000 ml

- soluţie Bryan sterilă (fără azot adăugat) compusă din:

KCl	10 g
$CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$	2,5 g
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2,5 g
$Ca_3\ (PO_4)_2$	2,5 g
$Fe_2(SO_4)_3 \cdot 6\ H_20$	2,5 g

Se amestecă toate sărurile într-un mojar. Se mojarează până se obţine o pudră fină. Apoi, 1,5 g amestec de săruri se adaugă la 100 ml apă distilată. Se autoclavează la 120^0 C, timp de 30 minute şi se foloseşte ca soluţie nutritivă.

- soluţie Bryan sterilă, cu azot adăugat. Se prepară ca şi soluţia Bryan, dar în loc de $CaSO_4 \cdot 2\ H_2O$ se adaugă $Ca(NO_3)_2$.
- alcool etilic 95 %;
- $HgCl_2$, soluţie 0,1 %;
- apă de robinet sterilă;
- cutii Petri sterile;
- soluţie de albastru de metilen Löeffler;
- eritrozină fenicată (carbol eritrozină); se compune din două soluţii: soluţia A – eritrozină 5 % în alcool etilic 70 %; soluţia B – eritrozină 1 % în fenol 5 %. Se colorează cu soluţia A 10 minute, după care se spală şi se colorează cu soluţia B încă 10 minute;
- nisip grosier, spălat.

Tehnica de lucru:

Examinarea bacteriilor din nodozităţile radiculare

Se lucrează cu nodozităţi radiculare de la plante leguminoase proaspete. Suprafaţa nodozităţilor se sterilizează cu $HgCl_2$, soluţie 0,1 %.

În acest scop, se introduc nodozitățile radiculare într-un cristalizor cu soluție de sublimat și se țin două minute. Apoi se spală bine cu apă de robinet sterilă. În continuare, o nodozitate se suspendă în câteva picături de apă de robinet sterilă (3-5 picături). Se zdrobește nodozitatea cu o pensetă sterilă și se amestecă bine cu apa. Apoi se transferă o picătură pe o lamelă curată și se execută un preparat în picătură suspendată. Din același amestec se mai efectuează două preparate. Se usucă, se fixează cu alcool etilic 95 %, timp de 10 minute. Un frotiu se colorează cu albastru de metilen Löeffler timp de trei minute, iar celălalt cu eritrozină fenicată. Se spală, se usucă și se examinează la microscop. Se notează forma, dimensiunile și caracteristicile de colorare ale bacteriilor din nodozități.

Izolarea rizobiilor din nodozități

Se spală rădăcinile cu nodozități de pământ și cu grijă se taie o nodozitate de pe rădăcină, lăsând și o mică porțiune a rădăcinii atașate. Îndepărtăm la un curent de apă orice particulă de sol de pe nodozitate. Se pune nodozitatea într-o cutie Petri cu soluție de $HgCl_2$ și se ține în stare imersată timp de cinci minute. Se utilizează apoi o pensetă sterilă pentru a transfera nodozitatea într-o altă cutie Petri ce conține apă de robinet sterilă. Se spală bine după care se transferă într-un vas (cristalizor) cu alcool etilic 95 %, unde se ține timp de trei minute. Se scoate și se clătește în apă de robinet sterilă. Apoi se iau șase cutii Petri sterile notate de la 1-6. Se introduce în fiecare 1 ml apă de robinet sterilă. Se scoate nodozitatea din apa de robinet sterilă și se introduce în cutia Petri 1. Aici se zdrobește cu ajutorul unei pensete sterile. Se amestecă bine țesutul nodular cu apa. Se transferă apoi două încărcături de ansă (câte o picătură de lichid în ochiul ansei) în cutia Petri 2 și se clătește ansa în apa de robinet sterilă. Se omogenizează bine suspensia. Se repetă apoi această operație și la cutiile Petri 3, 4, 5 și 6. În cele șase cutii se toarnă apoi mediul nutritiv cu manitol-extract de drojdii-roșu Congo-agar, lichefiat și răcit la 45-48^0 C. Se omogenizează bine mediul cu suspensia bacteriană. După solidificarea mediului, cutiile Petri se pun la incubat la 28^0 C pentru șapte zile. După incubare, se examinează coloniile apărute. Se efectuează preparate microscopice între lamă și lamelă, precum și frotiuri colorate. Colorarea se face cu albastru de metilen Löeffler.

Formarea nodozităților la lucernă

Se utilizează opt tuburi de sticlă de dimensiunile 250/25 mm. În fiecare tub se adaugă 50 g nisip de cuarț spălat. În primele patru tuburi se adaugă câte 10 ml soluție Bryan sterilă, fără azot adăugat, iar în ultimele

patru tuburi câte 10 ml soluție Bryan sterilă cu azot adăugat. Se amestecă bine nisipul cu soluția Bryan. Tuburile se închid cu dopuri de vată și se autoclavează la 120^0 C, 30 minute. În continuare, se distruge microbiota de pe suprafața semințelor de lucernă în felul următor: se pun semințele în cutii Petri sterile și se acoperă cu alcool etilic 95 %, lăsându-se să stea cinci minute, apoi se îndepărtează alcoolul și se adaugă soluție de $HgCl_2$ și se ține cinci minute. În final, se spală de șase ori cu apă de robinet sterilă.

Cu ajutorul unei pensete sterile se transferă câte 2-4 semințe cu suprafața sterilizată, în tuburile 1, 2 respectiv 5, 6. Se inoculează semințele cu o suspensie densă de *Rhizobium meliloti*. Suspensia bacteriană se toarnă direct peste semințe și se omogenizează bine. Apoi, cu ajutorul unei pensete sterile se introduc câte 2-4 semințe din acest amestec în tuburile 3, 4 respectiv 7, 8.

Tuburile astfel pregătite se mențin la lumină, adăugându-se apă distilată sterilă sau soluție Bryan sterilă, pentru a menține o umiditate corespunzătoare a nisipului. Se notează viteza de creștere a plantelor în toate tuburile, urmărindu-se diferențele dintre plantele crescute din semințe neinoculate și cele crescute din semințe inoculate, fără (sau) cu adaos de azot. După câteva săptămâni (5-10) se spală nisipul de pe rădăcini. Se observă gradul de nodulare și tipul de nodozități, precum și vigoarea, dimensiunile și culoarea plantelor. Se fac și determinări de substanță uscată. Conținutul nodozităților se examinează la microscop și se compară imaginea obținută cu observațiile efectuate la nodozitățile existente la plantele crescute în condiții de câmp.

16.1.2. Proteoliza

Substanțele proteice de origine vegetală și animală sunt supuse unui proces de mineralizare sub acțiunea microorganismelor proteolitice. La degradarea proteinelor participă o microbiotă bogată și puțin specializată.

Printre microorganismele proteolitice cele mai frecvente sunt: *Bacillus subtilis, B. cereus, B. mesentericus, B. megaterium, B. anthracis, Pseudomonas fluorescens, Serattia marcescens, Escherichia coli, Sarcina lutea*. Există organisme proteolitice și printre ciuperci, streptomicete, dar activitatea lor este mult mai slabă decât a majorității bacteriilor și ciupercilor.

Aceste microorganisme degradează macromoleculele proteice la compuși mai simpli (peptone, peptide, aminoacizi etc.) sub acțiunea proteazelor microbiene extracelulare.

Proteoliza este o etapă nespecifică, realizată de o microbiotă heterotrofă nespecifică.

Etapa specifică este legată de activitatea biologică a unor microorganisme din microbiota constantă a solului, care utilizează produşii amintiţi rezultaţi din etapa precedentă.

Pentru evidenţierea fenomenului de proteoliză se poate folosi o metodă simplă – metoda Lauthraup. Se folosesc fâşii de film developat, de 6 cm lungime şi 0,5 cm lăţime, sterilizate prin tindalizare. Aceste benzi se introduc în tuburi de hemoliză care conţin 2 ml soluţie Winogradsky sterilă, diluată 1/20. Se însămânţează fiecare tub cu 1 ml diluţie probă de analizat. După câteva zile, în cazul unei **reacţii pozitive**, filmul atacat devine transparent datorită atacului microbian asupra păturii fine de gelatină de pe film, în timp ce porţiunea din afara mediului rămâne neagră.

Determinarea cantitativă a bacteriilor proteolitice se poate face şi pe mediu cu gelatină:

gelatină	30 g
$FePO_4$	0,1 g
apă de mare	900 ml
apă distilată	100 ml

pH =7,0-7,2

Se repartizează câte 5 ml în eprubete şi se sterilizează la 110^0 C, 20 min. Pentru controlul mediului se iau 3 eprubete după sterilizare şi se pun la rece: gelatina trebuie să se solidifice.

16.1.3. Amonificarea

Este o altă etapă importantă din circuitul biologic al azotului ce constă în descompunerea substanţelor proteice vegetale şi animale, precum şi altor substanţe cu azot, până la NH_3, CO_2 şi H_2O.

Procesul de amonificare are loc sub acţiunea unei microbiote bogate şi puţin specializate, ce aparţine la toate grupele sistematice, dar ponderea cea mai mare o deţin bacteriile. Cele mai active sunt speciile: *Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas putida, Escherichia coli, Bacillus subtilis, B. cereus, B. mesentericus, B. megaterium, B. mycoides, B. putrificus, Clostridium perfringens* dintre bacterii, şi *Oidium lactis, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Rhizopus nigricans* dintre ciuperci.

Pentru evidenţierea procesului de amonificare, precum şi a microorganismelor care îl realizează se foloseşte efectul selectiv al unor medii nutritive speciale care oferă condiţii de dezvoltare acestora.

Materiale necesare:

- eprubete de 22/2 cm sterile;
- eprubete de hemoliză;
- pipete gradate sterile;
- baloane indice iod sterile;
- cilindri sterili;
- mojar de sticlă steril;
- reactiv Nessler;
- probă de sol;
- mediu de cultură cu următoarea compoziţie:

soluţie salină standard	50 ml
asparagină	0,5 g
bacto-peptonă	0,1 g
tripticază	0,1 g
extract de levuri	0,1 g
soluţie oligoelemente	0,1 ml
apă distilată	până la 1000 ml

Soluţia salină standard (Winogradsky):

K_2HPO_4	5 g
$MgSO_4$	2,5 g
NaCl	2,5 g
$Fe(SO_4)_3$	0,05 g
$MnSO_4$	0,05 g
apă distilată	1000 ml

pH = 7-7,5 (se ajustează cu NaOH 10 %)

Soluţia se repartizează în flacoane şi se sterilizează 20 minute la 121^0 C.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Soluția de oligoelemente:

molibdat de potasiu	0,05 g
borat de sodiu	0,05 g
perclorură de fier	o picătură
azotat de cobalt	0,05 g
sulfat de cadmiu	0,05 g
sulfat de cupru	0,05 g
sulfat de zinc	0,05 g
sulfat de mangan	0,05 g
apă distilată	1000 ml

Mediul de cultură se repartizează câte 10 ml în eprubete și se sterilizează 20 minute la 115^0 C.

Se însămânțează cu suspensii – diluții de sol un mediu lichid salin, la care se adaugă asparagină ca sursă de C și N și se cercetează apariția NH_3 cu reactivul Nessler.

Tehnica de lucru:

Se cântăresc 10 g din proba de sol și se trec într-un mojar steril. Se mojarează solul cât mai fin posibil și se transvazează într-un balon indice iod cu capacitatea de 300 ml, cu 100 ml apă sterilă. Se agită balonul la un agitator mecanic timp de 30 minute pentru realizarea unei suspensii omogene. Se realizează astfel diluția de sol 1/10 sau 10^{-1}. Din această diluție se transferă cu o pipetă sterilă 10 ml în al doilea balon indice iod care conține 90 ml apă sterilă. Se agită din nou la agitatorul mecanic 10 minute și se obține diluția 1/100 sau 10^{-2}. În același mod se realizează și diluțiile următoare. Suspensiile-diluții de sol obținute se folosesc imediat la însămânțarea mediilor de cultură.

Se însămânțează câte trei eprubete cu mediu pentru fiecare diluție, cu câte 1 ml suspensie de sol. Se incubează la 28^0 C.

Citirea rezultatelor se face la anumite intervale de timp: 3, 5, 7, 10 și 15 zile, în modul următor: se prelevează steril cu o pipetă gradată câte 1 ml din fiecare eprubetă însămânțată, începând cu diluția cea mai mare spre cea mai mică și se pune într-o eprubetă de hemoliză. Se adaugă apoi în fiecare eprubetă câte două picături de reactiv Nessler și se agită eprubeta. Apariția unei culori galben-oranj indică prezența NH_3 în mediu – **reacție pozitivă.**

Pentru evidențierea microorganismelor amonificatoare, se

efectuează din depozitul de pe fundul eprubetelor cu reacție pozitivă preparate, care se colorează Gram și se examinează la microscop.

16.1.4. Nitrificarea

În urma procesului de amonificare în sol se acumulează NH_3. Când condițiile ecologice sunt favorabile, NH_3 este oxidat pe cale biologică până la azotați, proces care poartă numele de nitrificare. Acest proces este realizat de microorganisme numite nitrificatoare, care pot fi autotrofe și heterotrofe.

Nitrificarea autotrofă este realizată de două grupe de bacterii înalt specializate, care își pot procura întreaga energie de care au nevoie din oxidarea azotului amoniacal sau nitros. Procesul se petrece în două etape succesive (nitritarea și nitratarea), fiecare etapă constând dintr-o serie de reacții specifice care implică anumite grupe de bacterii.

Nitritarea este procesul oxidării NH_3 până la nitriți care se realizează cu participarea unor specii ce aparțin genurilor *Nitrosomonas, Nitrosococcus, Nitrosospira, Nitrosogloea, Nitrocystis*.

Nitratarea sau oxidarea nitriților în nitrați, ce pot fi utilizați de plante, este realizată de următoarele bacterii nitrice mai importante: *Nitrobacter winogradskyi, Nitrobacter agilis* și unele specii de *Nitrocystis*.

Pentru evidențierea acestor două etape ale procesului de nitrificare și a microorganismelor implicate se însămânțează suspensii-diluții de sol pe medii lichide elective, repartizate în eprubete.

Mediul de cultură pentru **bacteriile nitroase** are următoarea compoziție:

soluție salină standard	50 ml
sulfat de amoniu	0,5 g
carbonat de calciu	1 g
apă distilată	950 ml

Mediul de cultură pentru **bacteriile nitrice** are următoarea compoziție:

soluție salină standard	50 ml
azotit de sodiu	1 g
carbonat de calciu	1 g
apă distilată	950 ml

Se repartizează fiecare mediu în tuburi de hemoliză, câte 1 ml în fiecare tub. Se sterilizează la autoclav timp de 10 minute la 115^0 C.

Se însămânțează câte cinci eprubete de diluție, cu 0,5 ml suspensie de sol pentru fiecare tub. Se incubează 20 zile la temperatura de 28^0 C.

Se cercetează apoi prezența nitriților sau nitraților cu difenilamină sulfurică, preparată astfel:

difenilamină	10 g
acid sulfuric	1000 g

Aceste amestec se varsă peste 20 ml apă distilată.

Citirea rezultatelor:

Pentru evidențierea **nitriților** se golesc aproape complet tuburile de hemoliză, așa fel încât să nu conțină mai mult de 1-2 picături de mediu. Se pun apoi în fiecare tub 10 picături de acid sulfuric și 10 picături de difenilamină sulfurică. Prezența nitriților (***reacție pozitivă***) se traduce prin apariția unei culori albastre intense la concentrații mari, uneori trecătoare la concentrații limită.

Pentru punerea în evidență a **nitraților** în mediul de cultură, se golesc aproape complet tuburile și se adaugă în fiecare tub cca. 50 mg uree, 10 picături de acid sulfuric și 10 picături de difenilamină sulfurică. Prezența nitraților (***reacție pozitivă***) se traduce prin apariția aceleeași culori albastre ca mai sus.

Din depozitul de pe fundul eprubetelor în care reacția nitriților și nitraților este pozitivă, se fac frotiuri, se colorează Gram și se examinează la microscop.

16.1.5. Denitrificarea

Este procesul de reducere a nitraților, în urma căruia pot rezulta compuși chimici foarte variați: nitriți, amoniac, azot molecular.

Denitrificarea constituie, în general, un proces dăunător deoarece diminuează cantitatea de azot asimilabil din sol.

Speciile de microorganisme capabile să producă denitrificarea completă până la N_2O sau N_2, respectiv microorganismele denitrificatoare specifice, sunt puține. Ele aparțin genurilor *Bacillus, Pseudomonas, Achromobacter, Micrococcus, Spirillum.* Marea majoritate a microorganismelor denitrificatoare sunt heterotrofe, deși se cunosc câteva

specii autotrofe (*Thiobacillus denitrificans*).

Pentru evidențierea procesului de denitrificare se însămânțează suspensii diluții de sol într-un mediu lichid în care azotul se află sub formă de nitrați.

Mediul de cultură are următoarea compoziție:

soluție salină standard	50 ml
azotat de potasiu	20 g
glucoză	10 g
carbonat de calciu	5 g
soluție de oligoelemente	1 ml
apă distilată	până la 1000 ml

Mediul se repartizează în tuburi de 22/2 cm, cu câte 10 ml şi se sterilizează la autoclav 20 minute la 115^0 C.

Însămânțarea se face cu 1 ml suspensie-diluție de sol pentru fiecare tub. Se însămânțează câte trei tuburi pentru fiecare diluție şi se incubează la 28^0 C.

După 7-15 zile de incubare se prelevează steril din fiecare tub cu o pipetă sterilă două picături de lichid, începând cu diluția cea mai mare şi se introduc în tuburi de hemoliză. Se cercetează în toate tuburile prezența nitraților cu difenilamină sulfurică, după ce s-au eliminat nitriții ce se pot forma. În fiecare tub se adaugă 50 mg uree, 10 picături acid sulfuric şi 10 picături de difenilamină sulfurică. În eprubetele în care au rămas nitrați apare coloratia albastră (***reacție negativă***). Eprubetele în care nitrații au dispărut sunt incolore (***reacție pozitivă***). În alte eprubete reacția poate fi parțială.

16.2. CIRCUITUL CARBONULUI

Carbonul, ca principal element chimic biogen, intră în componența tuturor substanțelor organice.

Circuitul carbonului în natură prezintă o importanță primordială şi se realizează printr-o diversitate de mecanisme şi în mai multe etape (Fig. 107).

Una dintre aceste etape o reprezintă mineralizarea substanțelor organice şi degajarea CO_2.

Materia organică prezentă în sol sau în bazinele acvatice este deosebit de variată, sursa sa principală fiind reprezentată de resturile

vegetale (frunze moarte, tulpini, rădăcini, fructe), cadavre animale, dejecte animale, microorganisme moarte, substanțe organice sintetice etc. Toate aceste substanțe sunt supuse unor procese de biodegradare prin variate mecanisme biochimice. Indiferent de natura acestor procese și de produșii intermediari formați, biodegradarea are ca ultim scop mineralizarea totală a substanțelor organice și eliminarea CO_2.

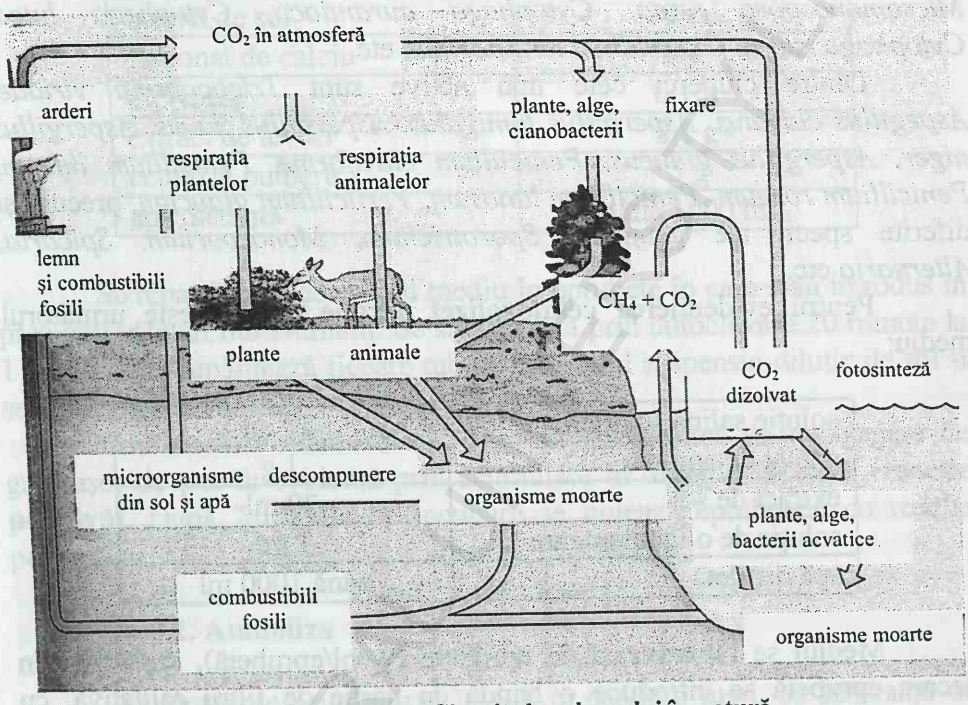


Fig. 107 – Circuitul carbonului în natură

Din marea varietate a substanțelor organice acumulate în sol și ape, sursa principală a acestora o reprezintă resturile vegetale bogate în hidrați de carbon și substanțele aromatice. Biodegradarea acestor substanțe prezintă o deosebită importanță.

16.2.1. Celulozoliza

Celuloza (polizaharid complex) este componenta principală a țesuturilor vegetale și cel mai important compus cu carbon din sol și ape.

Biodegradarea celulozei până la CO_2 și apă poartă numele de **celulozoliză** și este realizată de o mare varietate de microorganisme celulozolitice, aerobe și anaerobe, aparținând bacteriilor și ciupercilor. Toate aceste microorganisme sintetizează și elimină extracelular celulaza,

un complex enzimatic constituit din mai multe componente.

Cele mai importante specii de bacterii celulozolitice sunt: *Vibrio agarliquefaciens, Cellvibrio ochraceus, Cellvibrio flavescens, Cellvibrio fulvus, Cellvibrio vulgaris, Cellulomonas aerogenes, Cellulomonas gelida, Cellulomonas muscosus, Chromobacterium rossicus, Bacillus termocellulolyticus, Bacterium albidum, Streptomyces cellulose, Micromonospora fusca, Cytophaga aurantiaca, Cytophaga lutea, Cytophaga rubra, Clostridium termocellum* etc.

Dintre ciuperci cele mai active sunt *Trichoderma viridae, Aspegillus clavatus, Aspergillus fumigatus, Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus glaucus, Penicillium claviforme, Penicillium luteum, Penicillium roseum, Penicillium lanosum, Verticillium glaucum*, precum şi diferite specii ale genurilor *Sporotrichum, Monosporium, Spicaria, Alternaria* etc.

Pentru evidenţierea **celulozolizei aerobe** se foloseşte următorul mediu:

soluţie salină standard	50 ml
azotat de amoniu	1 g
extract de sol	20 ml
soluţie de oligoelemente	1 ml
apă distilată	până 1000 ml

Mediul se repartizează în eprubete (9 ml/eprubetă), după care în fiecare eprubetă se introduce o bandă de hârtie de filtru calitativă, cu lungimea de 7-8 cm şi lăţimea de 1 cm (celuloza din hârtie reprezintă sursa de carbon şi energie). După repartizarea mediului, banda de hârtie trebuie să depăşească nivelul lichidului cu 1-2 cm. Se autoclavează 20 minute la 115^0 C.

Însămânţarea tuburilor cu mediu se face cu câte 1 ml suspensie de sol, iar incubarea la termostat la 28^0 C timp de 15 zile. După acest interval de timp, cultura germenilor celulozolitici aerobi se traduce prin apariţia de pete pigmentate pe porţiunea de hârtie de filtru aflată în afara mediului.

Atunci când atacul microbian este puternic, hârtia de filtru se rupe la nivelul suprafeţei lichidului din eprubetă (**reacţie pozitivă**). Când atacul microbian este mai puţin intens, pentru observarea fenomenului este necesar să procedăm la o uşoară agitare, pentru a se detaşa partea inferioară a hârtiei.

Din porţiunile deteriorate ale hârtiei de filtru se prepară frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la microscop (obiectivul cu imersie). Se

urmăreşte forma şi tipul microorganismelor.

Pentru **celulozoliza anaerobă** se foloseşte următorul mediu:

soluţie salină standard	50 ml
azotat de amoniu	2 g
bacto-peptonă	1 g
extract de sol	20 ml
carbonat de calciu	3 g
tripticază	0,1 g
extract de levuri	0,1 g
celuloză pulbere	5 g
apă distilată	până 1000 ml

Se repartizează câte 8 ml mediu în eprubete în care s-au introdus în prealabil câte un tub Durham. Se sterilizează prin autoclavare 20 minute la 115^0 C. Se însămânţează fiecare tub cu câte 1 ml suspensie-diluţie de sol şi se incubează la 28^0 C.

Celulozoliza anaerobă este însoţită întotdeauna de o degajare de gaz, uşor de pus în evidenţă prin acumulare în tuburile Durham (**reacţie pozitivă**). După 7-15 zile de incubare se notează eprubetele cu reacţie pozitivă.

16.2.2. Amiloliza

Amidonul se acumulează în sol, în cantităţi mari, ca substanţă de rezervă în diferite organe ale plantelor: rădăcini, tuberculi, rizomi, seminţe.

Degradarea amidonului se realizează rapid de către microorganisme (bacterii şi ciuperci). Acestea produc exoenzime (amilaze) care hidrolizează amidonul până la dextrine şi maltoză, iar mai departe până la glucoză.

Microbiota amilolitică nu este specifică, deoarece microorganismele care produc amilaze sunt extrem de variate şi numeroase : bacterii Gram pozitive şi Gram negative, sporulate şi nesporulate, aerobe şi anaerobe, actinomicete şi ciuperci filamentoase.

Pentru evidenţierea procesului de amiloliză şi a microbiotei ce îl realizează se foloseşte un mediu de cultură electiv care are următoarea compoziţie:

soluție salină standard	50 ml
extract de sol	10 ml
amidon	1,5 g
azotat de amoniu	1 g
soluție de oligoelemente	1 ml
peptonă	0,1 g
tripticază	0,1 g
extract de levuri	0,1 g
apă distilată	până 1000 ml

Amidonul din mediu reprezintă singura sursă de carbon. Se repartizează mediul în eprubete câte 10 ml şi se sterilizează la autoclav 20 minute la 110^0 C.

Însămânțarea se face cu câte 1 ml suspensie de sol pentru fiecare tub şi se incubează la termostat la 28^0 C. După o incubare de 3-5 zile se prelevează (câte 1 ml) din fiecare tub însămânțat şi se introduce într-o eprubetă de hemoliză. Se adaugă câte o picătură de soluție iodo-iodurată şi 2-3 ml apă. Dacă hidroliza amidonului este completă, mediul nu va avea decât o uşoară tentă galbenă (**reacție pozitivă**). Dacă hidroliza este parțială sau nulă, tenta variază între albastru violet până la roşu închis (**reacție negativă**).

Pentru observarea microbiotei amilolitice, din depozitul de pe fundul tuburilor cu reacție pozitivă se execută frotiuri care se colorează prin metoda Gram.

16.2.3. Pectinoliza

Pectinele sunt poliuronide din polimeri ai acidului D-galacturonic, asociați în anumite proporții cu pentoze şi hexoze. Pectinele formează substanța de legătură dintre fibrele celulozice. Ele sunt degradate pe cale aerobă sau anaerobă de către bacterii ce aparțin genurilor *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, actinomicete (*Sreptomyces, Nocardia)* precum şi un număr mare de ciuperci filamentoase din genurile *Fusarium, Penicillium, Aspergillus, Botrytis, Alternaria.* Toate aceste microorganisme pectinolitice conțin complexul enzimatic cunoscut sub numele de pectinază.

Procesul de descompunere a substanțelor pectice de către microorganisme se poate pune în evidență însămânțând cu suspensii-diluții de sol un mediu salin, la care se adaugă pectină ca unică sursă de carbon şi care gelifică mediul. Pectinoliza se apreciază prin lichefierea gelului de

pectină în funcție de timp și diluție.

Prepararea mediului de cultură:

1. Pătura de geloză:

agar	15 g
$CaCl_2$	5 g
apă distilată	1000 ml

Se topește geloza în soluție de clorură de calciu, se filtrează și se ajustează pH-ul la 7,5. Se repartizează apoi în eprubete câte 3 ml și se sterilizează la autoclav, 20 minute la 121^0 C.

2. Pătura de pectină:

pectină de măr	8 g
azotat de amoniu	2 g
soluție salină standard	50 ml
extract de sol	50 ml
apă distilată	900 ml

Într-un cristalizor se introduce amestecul de săruri, extractul de sol și apa, se aduce la 80^0 C, se introduce pectina la pH=8 cu NaOH N/10 (circa 5 ml). Se repartizează în tuburi de 22 cm, câte 15-20 ml în fiecare tub. Se autoclavează până la 121^0 C și se oprește încălzirea ori de câte ori se ajunge la această temperatură. Se reduce astfel la minimum degradarea moleculelor de pectină. În cele din urmă, mediul rămâne, după răcire, lichid și cu pH=7,2.

Însămânțarea

Într-un stativ se așază eprubetele cu pătura de geloză, după care se prelevează steril cu pipeta câte 2 ml mediu cu pectină din tuburi și se repartizează deasupra gelozei. Se adaugă apoi rapid în fiecare tub câte 1 ml suspensie-diluție de sol. Difuziunea calciului în pătura de pectină produce o gelificare în șase ore. Incubarea se face la 28^0 C, timp de 1-2 zile.

Citirea rezultatelor poate fi făcută imediat după scoaterea de la termostat. Pectinoliza se traduce prin lichefierea gelului de pectină (***reacție pozitivă***).

Bacteriile își încep activitatea pectinolitică cu mult timp înaintea ciupercilor și actinomicetelor. Ciupercile își încep activitatea numai spre a patra sau a cincea zi, iar actinomicetele mult mai târziu, abia după 15 zile.

Din tuburile cu reacție pozitivă se efectuează frotiuri, se colorează Gram şi se examinează la microscop (obiectivul cu imersie).

16.3. CIRCUITUL SULFULUI

Sulful, ca şi celelalte elemente biogene, suferă în natură o serie de transformări ciclice.

Forma sub care sulful se găseşte în natură poate fi minerală (sulf elementar, sulfaţi, sulfuri) sau organică. Plantele verzi utilizează sulful numai sub formă minerală, în principal sub formă de sulfaţi.

Totalitatea transformărilor pe care le suferă în biosferă compuşii organici şi minerali ai sulfului constituie circuitul sulfului (Fig. 108).

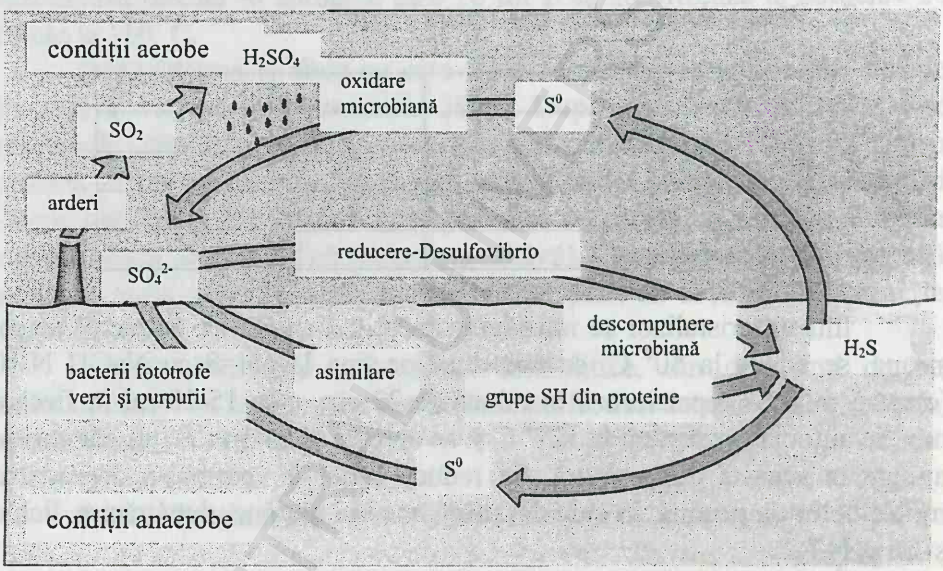


Fig. 108 – Circuitul sulfului în natură

Principalele etape ale circuitului sulfului sunt:

- încorporarea sulfului în substanţe organice;
- mineralizarea sulfului organic;
- oxidarea compuşilor minerali ai sulfului;
- reducerea compuşilor minerali ai sulfului.

16.3.1. Mineralizarea sulfului organic

O etapă importantă din circuitul sulfului în natură o reprezintă mineralizarea compuşilor organici cu sulf, care reprezintă cantitativ cea mai

importantă rezervă de sulf din sol.

Un număr mare de microorganisme heterotrofe (*Proteus, Serratia, Pseudomonas, Clostridium, Aspergillus,* etc.) produc mineralizarea sulfului organic. Etapele acestui proces de mineralizare sunt foarte complexe. Activitatea acestor microorganisme se datorește prezenței unor enzime care acționează asupra compușilor organici sulfurați, produșii intermediari și chiar finali fiind foarte variați în funcție de substanța organică mineralizată, de microorganismele care realizează acest proces și de condițiile ecologice în care are loc procesul de mineralizare. În condiții de anaerobioză, produsul final cel mai frecvent este H_2S.

Pentru evidențierea acestui proces, precum și a microbiotei ce îl realizează, se fac însămânțări din diluțiile de probe utilizate pe un mediu de cultură lichid (mediul Cahet) cu următoarea compoziție:

K_2HPO_4	0,5 g
glucoză	1 g
peptonă	1 g
soluție oligoelemente	10 picături
NaCl	5 g
apă distilată	1000 ml

Mediul trebuie să aibă pH=7,5. Se repartizează câte 10 ml mediu în fiecare eprubetă și se adaugă înainte de sterilizare, în fiecare tub, câte un cui. Sterilizarea se face la autoclav, 30 minute la 121^0 C.

Fiecare eprubetă se însămânțează cu câte 1 ml de diluție realizată din proba supusă analizei. După însămânțare se adaugă în fiecare tub, în mod steril, câte trei picături de clorhidrat de cisteină neutralizată 6 % (compus organic cu sulf) care se sterilizează prin filtrare la vid. Se incubează la termostat la 28^0 C, până la 21 zile.

Citirea rezultatelor se face față de un tub martor (neînsămânțat). ***Reacția pozitivă*** se traduce prin înnegrirea cuiului și a mediului de cultură, datorită H_2S rezultat din descompunerea cisteinei care împreună cu sărurile de fier formează sufura de fier ce dă culoarea neagră.

Din depozitul de pe fundul eprubetelor se fac frotiuri, se colorează Gram și se examinează la imersie.

16.3.2. Oxidarea compușilor minerali ai sulfului (sulfoxidarea)

Sulfoxidarea este un proces care se realizează pe cale chimică sau

biologică. Sulfoxidarea biologică în sol şi ape poate fi realizată de următoarele grupe de microorganisme: bacterii chimiolitotrofe din genul *Thiobacillus* (*T. thioparus, T. novellus, T. denitrificans* – care este specie anaerobă), bacterii heterotrofe, bacterii chimiolitotrofe din familia *Beggiatoaceae* şi bacterii fotolitotrofe din familiile *Chlorobacteriaceae* şi *Thiorhodaceae*. Primele două grupe sunt active mai ales în sol, ultimele două predomină în bazinele acvatice.

Tiobacilii oxidează sulfurile, tiosulfaţii şi sulful elementar până la sulfaţi.

Numeroase microorganisme heterotrofe aerobe (actinomicete, levuri, ciuperci filamentoase) sunt capabile să oxideze sulful elementar, tiosulfaţii în sulfaţi.

Hidrogenul sulfurat din ape, nămoluri şi din sol este oxidat în aerobioză de specii ale genurilor *Beggiatoa, Thioploca* şi *Thiothrix*. Sulful elementar rezultat se descompune intracitoplasmatic sub formă de granule refringente.

În condiţii de anaerobioză, oxidarea sulfurilor (H_2S) este realizată de bacteriile sulfuroase fotosintetizante verzi şi purpurii.

În grupa bacteriilor sulfuroase verzi sunt incluse numeroase genuri dintre care cele mai importante sunt: *Chlorobium* (*C. limicola, C. limicola* ssp. *thiosulfatophilum*) şi *Pelodictyon* (*P. agregatum*).

Chlorobacteriaceele sunt bacterii sulfuroase verzi care în marea lor majoritate nu au fost studiate prin examen microscopic direct în probele de ape sulfuroase. Numai două genuri au putut fi definite mai precis, fiind izolate în culturi pure şi studiate morfologic şi fiziologic. Este vorba, în primul rând de genul *Chlorobium* care cuprinde bacterii de dimensiuni mici (0,7-0,8/1,5 μm), imobile, ovoide sau sub formă de bastonaşe scurte, care adesea se dispun în lanţuri asemănătoare celor de la streptococi. Când se dezvoltă în medii puţin favorabile, celulele tind să ia formă de bacili alungiţi, filamente sau chiar spirale. Al doilea gen, *Pelodictyon*, cuprinde bacterii de dimensiuni ceva mai mari (0,5-1,5/2-4 μm). Celulele bacteriene se aşază în serii paralele (*P. luteolum*) sau formează reţele (*P. clathratiforme*).

Bacteriile sulfuroase verzi sunt locuitori permanenţi ai bălţilor mici murdare, canalelor, râurilor şi altor bazine de apă unde se găsesc substanţe organice în descompunere.

Familia *Chromatiaceae* cuprinde bacteriile sulfuroase purpurii care se diferenţiază unele de altele prin forma celulelor sau agregatelor lor. Sunt prezente în apele sulfuroase, apele stagnante.

Genul cel mai cunoscut este *Chromatium*. Speciile acestui gen

prezintă celule de formă ovală rotundă sau de bastonaş. Sunt mobile, cu cilii dispuşi monotrich. Celulele cultivate în medii bogate în H_2S prezintă granulaţii de sulf care dispar atunci când sulfurile din mediu sunt epuizate.

Genul *Thiospirillum* cuprinde specii cu celule în formă de spirili, mobili, lungi de 30-40 μm (unele din cele mai mici bacterii). Aceste bacterii trăiesc adesea în simbioză cu bacteriile sulfatoreducătoare care le furnizează H_2S.

Pentru determinarea acestor grupe de bacterii se efectuează diluţii din diferite probe: apă, apă de sondă, nămol terapeutic şi se însămânţează pe medii de cultură corespunzătoare.

Mediul de cultură pentru **evidenţierea microbiotei care oxidează sulful metaloid şi hidrogenul sulfurat** are următoarea compoziţie:

K_2HPO_4	0,25 g
$MgCl_2$	0,10 g
NaCl	0,10 g
NH_4NO_3	2 g
$CaCO_3$	5 g
apă distilată	1000 ml

pH natural

Se repartizează câte 5 ml de mediu în eprubete şi se sterilizează prin autoclavare timp de 30 minute la 121^0 C. Pentru prepararea mediului se va folosi un carbonat de calciu lipsit de sulfaţi.

Mediul de cultură pentru **evidenţierea microbiotei care oxidează tiosulfaţii la sulfaţi** are următoarea compoziţie:

K_2HPO_4	0,25 g
$MgCl_2$	0,10 g
NaCl	0,10 g
NH_4NO_3	2 g
$CaCO_3$	5 g
$Na_2S_2O_3$	1 g
soluţie oligoelemente	1 ml
apă distilată	până la 1000 ml

Se repartizează mediul în eprubete de hemoliză, câte 3 ml şi se sterilizează la autoclav 30 minute la 121^0 C.

Însămânţarea acestor două medii se face cu câte 1 ml suspensie din

probă.

În cazul determinării bacteriilor care oxidează sulful metaloid se adaugă aseptic în fiecare eprubetă o anumită cantitate de floare de sulf, iar în cazul oxidării H_2S eprubetele însămânțate se pun într-un exicator în care se introduce un pahărel cu câțiva ml dintr-o soluție de monosulfură de sodiu 10 %. Incubarea se face la 28^0 C, timp de trei săptămâni.

Citirea rezultatelor se face prelevând din fiecare eprubetă însămânțată, fără a agita, 1 ml lichid clar care se transferă într-o altă eprubetă peste care se adaugă două picături de HCl concentrat şi cinci picături dintr-o soluție de $BaCl_2$ 5 %. Apariția imediată a unei tulbureli sau a unui precipitat alburiu indică prezența sulfaților în mediu (**reacție pozitivă**). Se compară cu un tub martor neînsămânțat.

Mediul de cultură pentru bacteriile sulfuroase verzi şi purpurii (Trűper şi Pfening, 1981) se compune din:

$MgSO_4$	0,1 g
$MgCl_2$	0,1 g
$CaSO_4$	0,2 g
$CaCl_2$	0,1 g
KCl	0,2 g
acetat de magneziu	0,1 g
extract de levuri	0,02 g
extract de sol	10 ml
agar	10 g
apă distilată	până la 1000 ml

Mediul se repartizează câte 80 ml în flacoane de 150 ml şi se sterilizează 30 minute la 115^0 C. În momentul folosirii se lichefiază şi se adaugă următoarele soluții sterile:

vitamina B_{12}	1 ml
ascorbat de sodiu 0,5 %	1 ml
soluție de oligoelemente	1,7 ml
bicromat de sodiu 8 %	2 ml
monosulfură de sodiu	2 ml
acid fosforic 4 %	0,7 ml

Sterilizarea acestor soluții se face prin filtru Seitz.

Se repartizează mediul în tuburi înalte (Weinberg), de anaerobioză

şi când temperatura mediului a ajuns la 45^0 C se însămânţează cu câte 1 ml diluţie din probă. Se rulează tubul în mâini timp de câteva minute pentru răspândirea inoculului în toată masa mediului de cultură. Deasupra mediului din eprubetă se toarnă apoi 1-2 ml amestec steril de parafină şi ulei de parafină, pentru asigurarea condiţiilor de anaerobioză.

Incubarea tuburilor însămânţate se face timp de trei săptămâni la temperatura de 28-30^0 C şi în condiţii de expunere la lumină (se foloseşte un bec de 40 W). După incubare, din coloniile verzi şi roşii care s-au dezvoltat în coloana de mediu (**reacţie pozitivă**) se fac preparate între lamă şi lamelă şi se observă la microscop.

16.3.3. Reducerea compuşilor minerali oxidaţi ai sulfului (sulfatoreducerea)

În condiţii de anaerobioză sulfaţii sunt reduşi în sulfuri, proces numit sulfatoreducere. Fenomenul poate avea loc în sol, nămoluri, sedimente marine, ape marine, ape reziduale.

Microorganismele sulfatoreducătoare aparţin la două genuri:

a genul *Desulfovibrio* (vibrioni nesporulaţi), cu speciile *D. desulfuricans, D. vulgaris, D. gigas, D. africanus* etc.

b - genul *Desulfotomaculam* (bacili sporulaţi), cu trei specii: *D. nigrificans, D. orientis, D. ruminus*.

Toate speciile sulfatoreducătoare sunt anaerobe stricte şi reduc sulfaţii în H_2S.

Studiul bacteriilor sulfatoreducătoare necesită medii de cultură, de izolare şi de conservare specifice.

Mediul de cultură solid pentru izolarea bacteriilor sulfatoreducătoare (mediul Postgate) are următoarea compoziţie:

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1 g
Na_2SO_4	1 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1 g
$MgCl_2 \cdot 7H_2O$	2 g
lactat de sodiu sol.60 %	5,6 ml
extract de levuri	1 g
agar	15 g
apă distilată	1000 ml

Mediul se repartizează câte 10 ml în tuburi şi se autoclavează 20 minute la 115^0 C.

După autoclavare se adaugă în fiecare tub câte 0,1 ml sulfat de fier 5 %, 0,1 ml acid ascorbic 1 % şi 0,1 ml acid tioglicolic 1 %. pH-ul se ajustează la valoarea de 7,6. Soluţiile se sterilizează prin filtre de membrană.

Mediul lichid pentru izolarea bacteriilor sulfatoreducătoare (mediul Postgate) are compoziţia:

KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1 g
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	1 g
$MgCl_2 \cdot 7H_2O$	2 g
lactat de sodiu sol.60 %	5,6 ml
extract de levuri	1 g
acid ascorbic	1 g
$FeSO_4 \cdot 7\ H_20$	0,5 g
apă distilată	1000 ml

Mediul se repartizează câte 10 ml în tuburi şi se autoclavează 15 minute la 121^0 C. După autoclavare se adaugă în fiecare tub câte 0,1 ml acid tioglicolic 1 % şi se ajustează pH-ul cu puţin hidroxid de sodiu până la 7,6.

Însămânţarea se face cu 1 ml diluţie din probele utilizate.

În cazul mediului solid, însămânţarea se face după topirea în prealabil a mediului de cultură şi răcirea la 45^0 C.

Incubarea durează două săptămâni la 28 – 30^0 C în condiţii de anaerobioză (termostat cu vid) sau se toarnă peste mediul din eprubetă un strat de 2 – 3 mm de parafină sterilă.

Reacţia pozitivă se traduce prin înnegrirea mediului lichid sau apariţia de colonii negre pe mediul solid, datorită formării sulfurii de fier.

Prezenţa vibrionilor sulfatoreducători se controlează printr-un examen microscopic al preparatelor realizate din coloniile negre apărute în urma dezvoltării în mediul lichid sau solid. Observarea se face în contrast de fază sau după colorarea Gram a frotiurilor.

ANEXĂ

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

PREPARAREA COLORANȚILOR ȘI REACTIVILOR

1. Soluție de violet de metil:

violet de metil	0,2 g
apă distilată	100 ml

Se filtrează prin hârtie. Se folosește în coloraţia Gram (pentru coloraţia Gram se pot folosi, cu rezultate bune, violet de gențiană sau cristal violet).

2. Soluție de fucsină Ziehl:

soluție alcoolică saturată de fucsină bazică	10 ml
soluție 5 % fenol în apă distilată	100 ml

Se filtrează prin hârtie. Se folosește în coloraţia Ziehl-Neelsen. Această soluție diluată 1/10 cu apă distilată se folosește pentru colorații simple sau pentru recolorare în coloraţia Gram.

3. Soluție Lugol:

iod	1 g
IK	2 g
apă distilată	200 ml

Se solvă iodura de potasiu în circa 20 ml apă, se adaugă şi se solvă iodul, apoi se adaugă restul de apă. Se folosește ca mordant în coloraţia Gram.

4. Soluție iodo-iodurată:

iod	10 g
IK	25 g
apă distilată	1000 ml

Se folosește pentru evidențierea procesului de amiloliză.

BCU "ION CREANGĂ" UNIVERSITY LIBRARY

5. Soluții alcoolice saturate ale coloranților bazici:

colorant (albastru de metilen, violet de gențiană sau fucsină bazică)	10 ml
alcool etilic 96^0	100 ml

Se mojarează colorantul, se adaugă o parte din alcool și se continuă mojararea. Se transvazează într-o sticlă cu dop rodat. Restul alcoolului se adaugă treptat, în porțiuni mici, pentru a spăla colorantul din mojar, fiecare porțiune transvazându-se apoi în sticlă. Se menține sticla la 37^0 C timp de 7 zile cu agitare ocazională. Se filtrează prin hârtie. Filtratul reprezintă soluția alcoolică saturată a colorantului.

6. Soluție de albastru de metilen alcalin Lőeffler:

soluție alcoolică saturată de albastru de metilen	30 ml
soluție 1 % KOH	1 ml
apă distilată	100 ml

Se folosește pentru colorații simple sau pentru recolorare în colorația Ziehl-Neelsen.

7. Soluție de safranină:

safranină (soluție 2,5 în alcool etilic 96^0)	10 ml
apă distilată	100 ml

8. Soluție de verde malachit:

verde malachit	5 g
apă distilată	100 ml

9. Colorant Neisser:

Soluția A:

albastru de metilen	1 g
alcool 96^0	20 ml
acid acetic glacial	50 ml
apă distilată	1000 ml

Soluția B:

cristal violet	1 g
alcool 96^0	10 ml
apă distilată	300 ml

În momentul întrebuințării, se amestecă două părți soluție A cu o parte soluție B.

10. Colorant Giemsa (folosit pentru colorarea nucleului):

azur II eozină	3 g
azur II	0,8 g
glicerol	125 g
alcool metilic	375 ml

Se încălzeşte glicerolul la 60^0 C, se adaugă cei doi coloranți şi se agită până la dizolvarea completă. Amestecul se încălzeşte din nou la 60^0 C şi se adaugă apoi alcoolul metilic, se agită şi după 24 ore de păstrare la temperatura camerei, amestecul se filtrează prin hârtie de filtru.

11. Albastru de toluidină (folosit pentru colorația capsulei):

albastru de toluidină	0,5 g
alcool etilic 96^0	10 ml
acid fenic	3 g
apă distilată	până la 1000 ml

12. Coloranți pentru cili:

a) Soluția A- mordant fier-tanin

tanin (soluție apoasă 10 %)	18 ml
$FeCl \cdot 6\ H_2O$ (soluție apoasă 6 %)	6 ml
acid fenic	3 g

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

b) Soluția B- substanță colorantă mordant

soluție A	3,5 ml
fucsină bazică	0,5 ml
HCl conc.	0,5 ml
formalină	2,0 ml

13. Colorant Albert (folosit pentru evidențierea incluziunilor de volutină):

albastru de toluidină	0,15 g
verde de metil	0,20 g
acid acetic glacial	1 ml
alcool etilic 95^0	2 ml
apă distilată	100 ml

Se dizolvă albastrul de toluidină şi verdele de metil în apă distilată. Apoi se adaugă acidul acetic glacial şi alcoolul etilic. Se amestecă bine.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Aaronson, S., 1970 – ***Experimental Microbial Ecology***, Acad. Press, New York, London.
2. Ailiesei Octăvița, Erica Nimițan, Comănescu, Șt., 1980 – ***Lucrări practice de microbiologie generală***, Ed. Universității "Al. I. Cuza", Iași.
3. Ailiesei Octăvița, 1992 – ***Imunobiologie. Tehnici și metode de laborator***, Ed. Universității "Al. I. Cuza", Iași.
4. Alcamo, I.E., 2003 – ***Microbes and society, an introduction to microbiology***, Jones and Bartlett Publishers, Boston.
5. Alexander, S.K., Strete, D., 2001 – ***Microbiology: a photographic atlas for the laboratory***, Adison Wesley Longman, Inc., San Francisco.
6. Anghel, I., 1993 – ***Biologia și tehnologia drojdiilor***, vol. III, Ed. Tehnică, București.
7. Angle, S., Weaver, R.W., Bottomley, P., Bezdicek, D., Smith, S., Tabatabai, A., Wollum, A., 1994 – ***Methods of soil analysis– Microbiological and biochemical properties***, Soil Science Society of America, Inc., Wisconsin.
8. Artenie, V., Elvira Tănase, 1981 – ***Practicum de biochimie generală***, Ed. Universității „Al. I. Cuza", Iași.
9. Atlas, R.M., Bartha, R., 1998 – ***Microbial ecology – fundamentals and applications***, Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
10. Beishir, L., 1996 – ***Microbiology in Practice***, Addison-Wesley Educational Publishers, Inc., California.
11. Bourgaize, D., Jewell, T.R., Buiser, G.R., 2000 – ***Biotechnology,*** Benjamin/Cummings, Addison Wesley Longman, San Francisco.
12. Buiuc, D.T., 2003 – ***Microbiologie medicală – Ghid pentru studiul și practica medicinei***, ed. a VI-a, Ed. "Gr. T. Popa", Iași.
13. Dan Valentina, Oancea Ioana, Kramer Cristina, Zara Margareta, Tofan Clemensa, 1991 – ***Controlul microbiologic al produselor alimentare***, Ed. Univ., Galați.
14. Dan Valentina, Kramer Cristina, Bahrim Gabriela, Nicolau Anca, 1995 – ***Memorator drojdii***, Universitatea Galați, Facultatea de Industrie Alimentară și Acvacultură.
15. Dan Valentina, 1999-2000 – ***Microbiologia produselor alimentare***, vol. I, II, Ed. "Alma", Galați.

16. Drăgan-Bularda, M, 2000 – ***Lucrări practice de microbiologie generală***, Ed. Univ. "Babeş-Bolyai", Cluj-Napoca.
17. Dommergues, Y., Mangenot, F., 1970 – ***Écologie microbienne du sol***, Ed. Masson, Paris.
18. Eisenbarth, G.S., 1981 – ***Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research***, Anal. Biochem., 111, 1 – 16.
19. Eliade, G., Ghinea, L., Ştefanic, G., 1975 – ***Microbiologia solului***, Ed. Ceres, Bucureşti.
20. Gestin, J.L., Goldstein, F.W., Acar, J.F., 1991 – ***Atlas de bactériologie. Examens directs par coloration uzuelles***, Université Pierre et Marrie Curie, Paris.
21. Goers, J., 1993 – ***Immunochemical Techniques. Laboratory Manual.*** Acad. Press, New York.
22. Hatman, M., Ulea, E., 1993 – ***Microbiologia solului***, Ed. Univ. Agronomice "Ion Ionescu de la Brad", Iaşi.
23. Hudson, Barbara, Sherwood, Linda, 1997 – ***Explorations in Microbiology – a discovery based approach***, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
24. Johnson, T.R., Case, C.L., 1998 – ***Laboratory experiments in microbiology*** – Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., California.
25. Krieg, N.R., Holt, J.G., 1984 – ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol. I, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
26. Lim, D., 1998 – ***Microbiology***, sec. ed., WCB, McGraw-Hill, Boston.
27. Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., 2000 – ***Brock Biology of microorganisms***, 8th ed., Prentice Hall., Inc. Simon & Schuster, Viacom Company, New Jersey.
28. Mănescu, S., 1989 – ***Microbiologia sanitară***, Ed. Medicală, Bucureşti.
29. Măzăreanu, C., 1999 – ***Microbiologie generală***, Ed. Alma Mater, Bacău.
30. Nimiţan Erica, Octăvița Ailiesei, Simona Dunca, Comănescu, Şt., 1998 – ***Metode şi tehnici de microbiologie***, Ed. Universității "Al. I. Cuza ", Iaşi.
31. Nimiţan Erica, 1992 – ***Biotehnologii microbiene***, Ed. Universității "Al. I. Cuza", Iaşi.
32. Nimiţan Erica, Comănescu, Şt., Elena Marin, 1997 – ***Ecologia microorganismelor***, Ed. Cermi, Iaşi.

33. Nistorescu, N., 1965 – ***Bacteriologie medicală***, Ed. Medicală, Bucureşti.
34. Norrell, S.A., Messley, K.E., 1997 – ***Microbiology laboratory manual - Principles and applications***, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
35. Papacostea, P., 1980 – ***Biologia solului***, Ed. Ştiinţifică şi Enciclopedică, Bucureşti.
36. Pepper, I.L., Gerba, C.P., Brendecke, J.W., 1995 – ***Environmental Microbiology - a laboratory manual***, Acad. Press, Inc., San Diego.
37. Pochon, J., Tardieux, P., 1962 – ***Techniques en microbiologie du sol***, Ed. de la Tourelle, St. Mandé.
38. Popa Lidia, 1987 – ***Microbiologie industrială. Lucrări practice.*** Fac. de Biologie, Bucureşti.
39. Revillard, J.P., 1995 – ***Immunologie,*** 2e édition, De Boeck & Larcier S.A., Bruxelles.
40. Seeley, H.W., Vandemark, P.J., Lee, J.J., 1991 – ***Microbes in action – A laboratory manual of microbiology***, W. H. Freeman and Company, New York.
41. Silliker, J.H., 1980 – ***Microbial ecology of foods***, Acad. Press Inc., New York.
42. Sneath, P.H.A., Holt, J.G., 1986 – ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol. II, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
43. Staley, J. T., Holt, J. G., 1989 – ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol. III, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
44. Stolp, H., 1998 – ***Microbial ecology,*** Cambridge Univ. Press, Cambridge.
45. Sylvia, D.M., Fuhrmann, J.J., Hartel, P.G., Zuberer, D.A., 1999 – ***Principles and applications of soil microbiology***, Prentice Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
46. Tănase, C., Mititiuc, M., 2000 – ***Micologie***, Ed. Universităţii "Al. I. Cuza", Iaşi.
47. Tănase, C., 2002 – ***Micologie – Manual de lucrări practice***, Ed. Universităţii "Al. I. Cuza", Iaşi.
48. Topală, N.D., 1978 – ***Microbiologie generală***, vol. I şi II (curs litografiat), Ed. Universităţii "Al. I. Cuza", Iaşi.
49. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L., 2002 – ***Microbiology, an introduction***, Pearson Education, Inc., San Francisco.

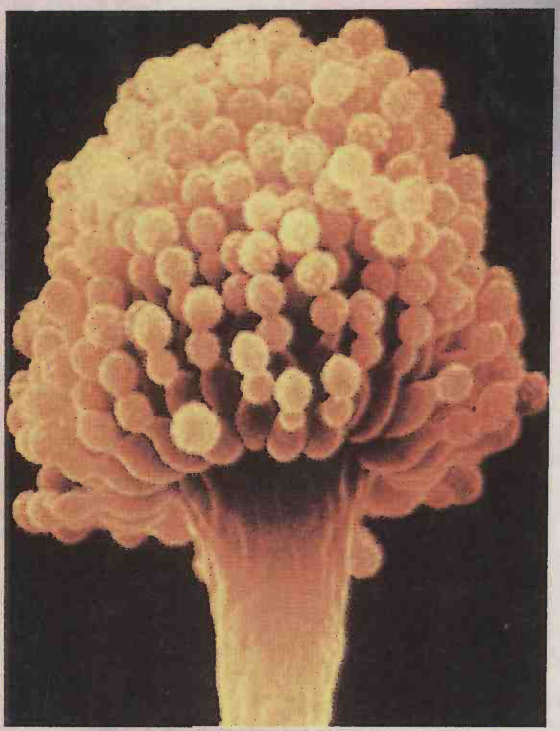
50. Williams, S.T., Holt, J.G., 1989 – ***Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***, vol. IV, Williams & Wilkins Company, Baltimore.
51. Wistreich, G.A., 1999 – ***Microbiology Laboratory***, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.
52. Zarnea, G., 1983 – ***Tratat de microbiologie generală***, vol. I, Ed. Academiei R.S.R., Bucureşti.
53. Zarnea, G., 1984 – ***Tratat de microbiologie generală***, vol. II, Ed. Academiei R.S.R., Bucureşti.
54. Zarnea, G., 1994 – ***Tratat de microbiologie generală***, vol. V, Ed. Academiei Române, Bucureşti.
55. Zarnea, G., Mihăescu, Gr., 1995 – ***Imunologie,*** Ed. Universităţii, Bucureşti.
56. xxx, 1977 – ***Instrucţiuni şi recomandări de utilizare a mediilor de diagnostic microbiologic***, Institutul "I. Cantacuzino", Bucureşti.
57. xxx, 1991 – ***STAS 3001-91 – Ape de suprafaţă***, Institutul Român de Standardizare.
58. xxx, 1998 – ***Standard*** M_2 – A_7 Villanova, P.A., – NCCLC (National Committee for Clinical Laboratory Standards) recommendations.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

B.C.U. „M. EMINESCU" IAŞI

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



ISBN 973-7603-79-6
9 789737 603791

IIAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY